

IS-ELEMENTE UND
GENOMUMSTRUKTURIERUNG
BEI RHIZOBIACEAE

von
Barbara Rüger
aus Nürnberg

Diss. Erlangen

1984 № 396



IS-ELEMENTE UND GENOMUMSTRUKTURIERUNG BEI RHIZOBIACEAE

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Barbara Rüger
aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 8.8.1984

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatter: Professor Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatter: Professor Dr. H. Pfister

<u>A. Zusammenfassung</u>	1
<u>B. Einleitung</u>	2
<u>C. Material und Methoden</u>	9
1. Medien, Zusätze, Puffer und Chemikalien	9
1.1. Nährmedien	9
1.1.1. Nährmedien für E. coli Stämme	9
1.1.2. Nährmedien für Rhizobienstämme	9
1.2. Zusätze zu Nährmedien	10
1.3. Puffer und Lösungen	10
1.4. Enzyme, Chemikalien und sonstiges Material	12
2. Bakterienstämme und Plasmide	14
2.1. Bakterienstämme	14
2.2. Plasmide	16
3. Genetische Methoden	16
3.1. Plasmidtransfer durch Kreuzung	16
3.1.1. Schnellkreuzung	16
3.1.2. Plasmidtransfer durch Filterkreuzung	17
3.2. Stressbedingungen	17
4. DNA-Isolierung und Aufarbeitung	18
4.1. Isolierung von Gesamt-DNA	18
4.2. Isolierung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichte- gradienten	19
4.2.1. Lysemethoden	19

4.2.1.1.	Sarcosyllyse	19
4.2.1.2.	"cleared lysate" Methode	21
4.2.1.3.	Isolierung von Plasmid DNA nach Hansen und Olsen	22
4.2.2.	CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation	23
4.2.2.1.	Isolierung von ccc-DNA	24
4.3.	Aufbereitung der DNA aus CsCl-Dichte- gradienten	25
4.3.1.	EtBr-Extraktion	25
4.3.2.	Dialyse	25
4.3.3.	Konzentrierung	25
4.3.4.	Deproteinisierung	26
4.3.5.	Äthanolgefällung von DNA	26
4.3.6.	Reinigung von DNA über Elutip-d Minisäulen	27
4.4.	Schnellverfahren zur Plasmidisolierung	27
4.5.	Darstellung von Plasmiden durch Lyse in den Agarosegeltaschen	28
5.	Dichtebestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge	30
6.	Restriktionsanalyse	30
6.1.	Spaltung mit Restriktionsenzymen	30
6.2.	Agarosegelelektrophorese	31
6.3.	Molekulargewichtsbestimmung der Fragmente	32
7.	Elektronenmikroskopie	33
7.1.	DNA Präparationsmethoden	33
7.1.1.	Dropletverfahren	33
7.1.2.	Spreitung von DNA	34
7.1.2.1.	Tris-Formamid Spreitung	35
7.1.2.2.	Carbonatspreitung	36

7.2.	Längenmessung von Plasmid-DNA	37
7.3.	Heteroduplexanalyse	37
7.4.	Homoduplexexperiment: Suche nach invertierten Sequenzen	39
8.	Southern-Transfer und DNA-DNA Hybridisierung	40
8.1.	Southern-Transfer von DNA auf Nitro- cellulosefilter	40
8.2.	Nick-Translation	42
8.3.	Hybridisierungsbedingungen	45
8.4.	Waschbedingungen und Autoradiografie	48

D. Ergebnisse 50

1.	Hybridisierung der Schemastämme mit dem IS-Element ISR1	50
1.1.	Hybridisierung verschiedener Klasse IV Stämme mit ISR1 und Bestimmung der Kopienzahl	52
1.1.1.	Hybridisierung <u>Hind</u> III verdauter Gesamt-DNA	55
1.1.2.	Hybridisierung <u>Xho</u> I verdauter Gesamt-DNA	56
1.1.2.1.	Nachweis einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym <u>Xho</u> I in ISR1	59
1.1.3.	Bestimmung der Kopienzahl von ISR1 in den Stämmen 1-932 und 33-5	61
1.1.4.	Hybridisierung der Klasse IV spezifischen Phagen mit ISR1	63
1.2.	Hybridisierung repräsentativer Stämme aller Klassen des Schemas der Genomumstruk- turierung der Rhizobiaceae mit dem IS- Element ISR1	64
1.2.2.	Hybridisierung unter stringenten Be- dingungen	64

1.2.2.	Hybridisierung unter relaxierenden Bedingungen	67
1.3.	Hybridisierung von Gesamt-DNA weiterer Wirtstypen mit dem Insertionselement ISR1	69
1.4.	Bestimmung der Stabilität des Insertionsortes von ISR1 in 1-932	72
2.	Hybridisierung der Schemastämme mit dem Insertionselement ISRM1	74
3.	Suche nach weiteren IS-Elementen in den Schemastämmen und in Wildtypstämmen	78
3.1.	Bestimmung der Resistenz der zu untersuchenden Stämme für Ampicillin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin	79
3.2.	Gewinnung von Streptomycin resistenten Stämmen	81
3.3.	RP4 Transfer in die zu untersuchenden Stämme und Resistenzanalyse der Transkonjuganten	81
3.4.	Erzeugung von RP4 Mutanten durch Stress	83
3.4.1.	Entwicklung geeigneter Stressbedingungen	83
3.5.	Rücktransfer der RP4 Mutanten nach E. coli	86
3.6.	Stabilität des Resistenzmusters in E. coli	90
4.	Plasmidanalyse der durch Stress erhaltenen RP4 Mutanten	92
4.1.	Physikalische und genetische Karte des RP4 Plasmids	92
4.2.	Analyse gereinigter Plasmid DNA der RP4 Mutanten	95
4.2.1.	Restriktionsanalyse	95

5.	Charakterisierung der beiden Insertions- mutanten SR36 (RP4::ISR2) und SR24 (RP4::ISR3)	101
5.1.	Dichtebestimmung in der analytischen Ultra- zentrifuge	101
5.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	104
5.2.1.	Längenmessung	104
5.2.2.	Heteroduplex- und Homoduplexanalyse	106
5.3.	Restriktionsanalyse von ISR2 und ISR3	115
5.3.1.	<u>Pst</u> I und <u>Sma</u> I Spaltung von ISR2 und ISR3	115
5.3.2.	Kartierung von ISR2 und ISR3 mit ver- schiedenen Restriktionsenzymen	119
5.4.	Aktivität von ISR2 und ISR3 in E. coli	124
5.4.1.	Stabilität der Resistenzmuster von RP4::ISR2 und RP4::ISR3 in E. coli	124
5.4.2.	Stabilität von RP4::ISR2 und RP4::ISR3 in E. coli RecA ⁺ und RecA ⁻	125
6.	Analyse der Hybridisierungseigenschaften von ISR2 und ISR3	127
6.1.	Hybridisierung mit verschiedenen Klasse III Stämmen und Bestimmung der Kopienzahl	127
6.2.	Untersuchung der Homologie zwischen ISR2 und ISR3	129
6.3.	Hybridisierung mit den Schemastämmen	130
6.3.1.	Hybridisierung unter stringenten Be- dingungen	130
6.3.2.	Hybridisierung unter relaxierenden Be- dingungen	132

E. Diskussion

133

1.	Hybridisierung der Schemastämme mit dem IS-Element ISR1	133
1.1.	Hybridisierung verschiedener Klasse IV Stämme mit ISR1	133
1.2.	Hybridisierung repräsentativer Stämme aller Klassen mit ISR1	135
1.3.	Stabilität von ISR1 im Klasse IV Genom unter Stressbedingungen	135
2.	Hybridisierung der Schemastämme mit dem IS-Element ISRM1	136
3.	Suche nach neuen IS-Elementen in Rhizobiaceae	137
3.1.	Isolierung weiterer IS-Elemente aus Rhizobiaceae durch Stress	137
3.2.	Notwendigkeit von Stressbedingungen zur Anregung der Translocation von IS-Elementen in Rhizobiaceae	138
4.	Charakterisierung der Insertionsmutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3	139
4.1.	Unterschiede im phänotypischen Resistenz- muster der RP4 Mutanten in Rhizobiaceae und in E. coli	139
4.2.	ISR2 und ISR3 - zwei neue IS-Elemente aus Rhizobien?	142
4.2.1.	IS-Elemente oder Transposonen	143
4.3.	Homologie von ISR2 und ISR3	144
4.4.	IS-Elemente und Genomstrukturierung der Rhizobiaceae	145

Anhang 1:	Verzeichnis der verwendeten Ab- kürzungen	147
Anhang 2:	Literaturverzeichnis	148

A. Zusammenfassung

DNA-Schäden und Stressbedingungen bewirken eine komplette Umorganisation des Rhizobiumgenoms. Aus dem Wildtyp können fünf verschiedene Klassen von Stämmen entstehen, die sich in ein Schema einordnen lassen, das als Schema der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae bezeichnet wird. Es wird angenommen, daß die Translocation von IS-Elementen ein wesentlicher Faktor des Rearrangements ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde Vorkommen und Verbreitung der beiden bisher aus Rhizobiaceae bekannten IS-Elemente, ISR1 und ISRM1, in den fünf Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß ISR1 spezifisch für Klasse IV Stämme ist. ISRM1 war in den Schemastämmen nicht nachzuweisen. Nach Stressbehandlung RP4 tragender Rhizobiumstämmen wurden zwei neue Insertions-elemente, ISR2 und ISR3, der Rhizobiaceae aus Klasse III Stämmen isoliert, die eine Länge von 6,55 bzw 7,29 kb aufweisen. ISR2 und ISR3 zeigen im Hetero- und Homoduplexversuch eine charakteristische Transposonstruktur. Für beide IS-Elemente wurde eine Restriktionskarte aufgestellt. Durch Hybridisierungsversuche wurde nachgewiesen, daß beide IS-Elemente große Homologien aufweisen. ISR2 und ISR3 scheinen spezifisch für Klasse III Stämme zu sein.

B. Einleitung

Die Familie der Rhizobiaceae besteht nach Bergey's Manual aus zwei Gattungen, Rhizobium und Agrobakterium. Es sind stäbchenförmige, gramnegative, obligat aerobe Bodenbakterien, die auf zwei verschiedene Arten mit Pflanzen in Wechselwirkung treten können. Die Rhizobien erkennen und infizieren die Wurzeln spezifischer Leguminosenpflanzen. (Übersichtsartikel s. W. D. Bauer, 1981; D. P. S. Verma, S. Long, 1983; C. P. Vance, 1983), und induzieren die Bildung von Wurzelknöllchen. In den Knöllchen differenzieren sich die Rhizobien zu verzweigten Bacteroiden (W. D. Sutton et al., 1981); die Gene, die das vegetative Zellwachstum steuern, werden ab-, und die Genregionen für symbiontische Stickstofffixierung (F. M. Ausubel, 1982) angeschaltet. Gleichzeitig wird Leghämoglobin gebildet, das die sauerstoffempfindliche Nitrogenase schützt. Dabei synthetisiert die Pflanze das Globin, und die Bakterien den Häm-Cofaktor. In den Knöllchen wird dann durch die Bacteroide atmosphärischer Stickstoff zu NH_4^+ reduziert, und an die Pflanze abgegeben.

Die Infektion einer Pflanze mit Agrobakterien führt dagegen nicht zu einer Symbiose, sondern zu Tumorstadium (Übersichtsartikel s. P. Zambryski et al., 1983). Die Bakterien dringen über zufällige Wunden in die Pflanze ein. Im Gegensatz zu den Rhizobien, die eine sehr hohe Wirtsspezifität zeigen, können Agrobakterien alle dicotyledonen Pflanzen infizieren. Die genetische Regulation der Pflanzenzelle durch die Agrobakterien ist bereits wesentlich besser aufgeklärt als das viel kompliziertere System der Rhizobium- Leguminosen-Symbiose. Virulente Agrobakterienstämme besitzen große Plasmide, die sog. Ti-

Plasmide (Tumor induzierende Plasmide). Ein Teil dieser Plasmide, die T-DNA, wird in die Pflanzenzelle transferiert und induziert dort die oncogene Transformation (Übersichtsartikel s. M. Chilton, 1982). Neben den Tumor induzierenden Funktionen (s. Gelvin, et al., 1983) codiert die T-DNA auch für seltene Aminosäuren, die Opine (L. Willmitzer et al., 1983). Die Pflanze wird dazu programmiert, diese Opine zu synthetisieren, die von den Agrobakterien als alleinige Stickstoff- und Energiequelle genutzt werden können. Diese Art des Parasitismus wird auch als "Opin-Farming" bezeichnet (J. Tempé und A. Petit, 1983).

Die sehr unterschiedlichen und komplexen Wechselwirkungen der Rhizobiaceae mit Pflanzen deuten bereits auf das sehr komplexe Genom dieser Familie hin. Agrobakterien und Rhizobien besitzen zusätzlich zum Chromosom eine Vielzahl verschiedener Plasmide. Die größten Plasmide der Agrobakterien sind 300 md, die größten Rhizobium-Plasmide, die auch als Megaplasmide bezeichnet werden, sogar 500 -900 md (M. P. Nuti et al., 1982; T. Huguet et al., 1983; R. G. Hadley und A. A. Szalay, 1982).

Im Verlauf seiner Untersuchungen zur Rhizobiengenetik fand Heumann (Heumann, 1979; Heumann, 1981; Heumann et al., 1983), daß Stressbedingungen eine komplette Umorganisation des Rhizobiumgenoms bewirken. Aus dem Wildtyp können fünf verschiedene Klassen von Stämmen entstehen, die in ein Schema eingeordnet wurden (Schema der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae). Diese fünf Klassen zeigen spezifische genetische und molekularbiologische Unterschiede in Resistenzmuster, Restriktions- und Modifikationssystem (K. Winkler, 1984), Restriktions-

muster, Plasmid-Gehalt und DNA-Dichte. Die Umstrukturierung der fünf Klassen ist reversibel. Die Stämme sind unter normalen Kulturbedingungen stabil. Werden sie jedoch erneut einer Stressbehandlung unterzogen, können sie wieder in eine andere der fünf Klassen umstrukturiert werden.

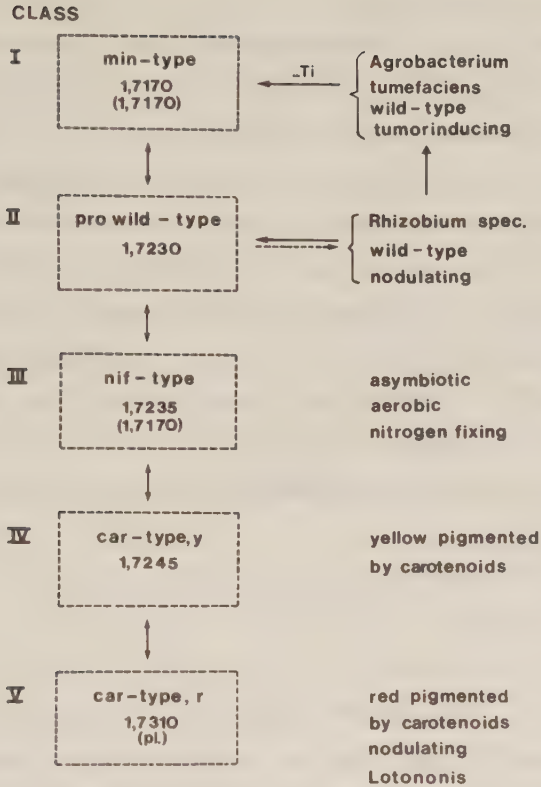
Neueste Ergebnisse mit UV-Mutagenese (Heumann, 1984) weisen jetzt darauf hin, daß der Genomumstrukturierung ähnliche Vorgänge zu Grunde liegen, wie sie für *E. coli* als "SOS-Repair" beschrieben werden (Übersichtsartikel s. J. W. Little und D. W. Mount, 1982).

Beschreibung der fünf Klassen

Abbildung 1 zeigt die fünf Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae, die durch Stress aus Wildtyp-Rhizobien und Agrobakterien erhalten werden.

Klasse 1: Minimaltyp

Minimaltypstämme sind *A. tumefaciens* Wildtypstämmen sehr ähnlich. Sie können als Stämme, die das Ti-Plasmid verloren haben, angesehen werden (I. Bauer, 1981). Es sind schnellwachsende Stäbchen mit einer Generationszeit von weniger als einer Stunde. Die Kolonien erscheinen weiß und können rauh oder glatt sein. Die Zellen sind begeißelt und sehr beweglich. Die Dichte der chromosomalen DNA und der Plasmid DNA beträgt 1,7170 g/ml. Minimaltypstämme besitzen im allgemeinen zwei Plasmide von 20 md und 300-320 md. Die Restriktionsmuster mit verschiedenen Restriktionsenzymen sind klassenspezifisch.



GENOME REARRANGEMENT OF THE RHIZOBIACEAE

Abb. 1: Schema der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae.

Die allgemeine Reversibilität der Klassen ist durch Pfeile angezeigt. Für jede Klasse ist die spezifische DNA Dichte angegeben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Plasmid-DNA-Dichte bei plasmidtragenden Stämmen.

Klasse II: Prowildtyp

Die Prowildtypstämme lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die sich in wenigen Merkmalen unterscheiden. Eine stammt von *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* und *R. trifolii* und noduliert Sojabohne effektiv. Sie ist daher identisch mit *R. japonicum*. Die andere Gruppe stammt von *A. tumefaciens*, *R. japonicum* und *R. lupini* und kann weder Tumoren induzieren, noch nodulieren. Die Kolonien beider Gruppen sind weiß und stark Schleim produzierend. Die Stämme wachsen sehr langsam. Die Dichte der chromosomalen DNA beträgt 1,7720 g/ml. Die Prowildtypstämme sind plasmidfrei. Die Restriktionsmuster sind klassenspezifisch, aber in beiden Gruppen unterschiedlich. Auffallend ist der schrittweise Abbau der Wirtsspezifität und der gleichzeitige Plasmidverlust.

Klasse III: Nif-Typ

Die Bakterien dieser Klasse wachsen sehr schnell mit einer Generationszeit von weniger als einer Stunde. Sie zeichnen sich durch eine relativ variable Koloniemorphologie aus. Die wichtigste Eigenschaft dieser Stämme ist jedoch die freilebende, asymbiotische Stickstofffixierung unter aeroben Bedingungen. Die chromosomale DNA weist eine Dichte von 1,7235 g/ml auf. Nif-Typ Stämme besitzen im allgemeinen zwei große Plasmide mit einem Molekulargewicht von 130 md und 220 md. Die Dichte der Plasmid DNA beträgt 1,7170 g/ml. Die Restriktionsmuster verschiedener Stämme sind wiederum identisch und klassenspezifisch.

Klasse IV: Gelbe Carotinoidtypen (Car-Typ y)

Das Hauptmerkmal dieser Klasse ist ihre kräftige, gelbe Färbung, die durch die Bildung eines spezifischen Carotinoids entsteht (H. Kleinig et al., 1977). Die Stämme haben ein sehr fertiles Konjugationssystem (Heumann, 1979) und lassen sich auf Grund ihrer Morphologie in zwei Gruppen einteilen. Die eine wächst stäbchenförmig, die andere hat eine bacteroid-ähnliche Morphologie (Heumann, 1981). Die DNA Dichte beider Gruppen beträgt 1,7245 g/ml. Die Stämme sind plasmidfrei. Beide Gruppen zeigen die gleichen, klassenspezifischen Restriktionsmuster.

Klasse V: Rote Carotinoidtypen (Car-Typ r)

Diese Stämme sind durch eine C_{30} -Carotinoidsäure rot pigmentiert (H. Kleinig et al., 1979; H. Kleinig und R. Schmitt, 1982; H. Kleinig und W. J. Broughton, 1982). Die Zellen sind sehr groß und polar monotrich begeißelt. Die Dichte der chromosomalen DNA liegt zwischen 1,7290 g/ml und 1,7310 g/ml. Manche Stämme weisen zwei bis sieben Plasmide von 12 md bis 350 md auf. Andere Stämme sind plasmidfrei. Die Restriktionsmuster sind wiederum klassenspezifisch. Ein australischer Stamm dieser Klasse noduliert effektiv *Lotononis bainesii*.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von IS-Elementen bei der Genomstrukturierung der Rhizobiaceae zu untersuchen. IS-Elemente, Transposonen und repetitive Sequenzen sind als Auslöser von Genom-Rearrangement bei Pro- und Eucaryonten bereits beschrieben (Übersichtsartikel s. A. Campbell, 1981; S. Iida et al., 1983; J. A. Shapiro

und B. Cordell, 1982). In den meisten, bisher untersuchten Fällen ist die Genomumstrukturierung jedoch auf wenige, spezifische Genorte beschränkt (J. R. Young, 1982; P. Early und L. Hood, 1981). Ein anderes, bisher beschriebenes System, das eine ähnlich umgreifende Genomumorganisation wie das der Rhizobiaceae zeigt, wurde von der Arbeitsgruppe um Doolittle (C. Sapienza und W. F. Doolittle, 1982; C. Sapienza et al., 1982; M. Simsek et al., 1982) an Halobakterium halobium untersucht.

Durch spontanes Genom-Rearrangement wird bei den zu den Archaeobakterien gehörenden Halobakterien eine Mutationsfrequenz von 10^{-4} - 10^{-2} pro Zelle beobachtet. Ursächlich für dieses Rearrangement ist eine hohe Anzahl repetitiver Sequenzen (ca. 50 verschiedene Familien), die chromosomal und extra-chromosomal lokalisiert sind.

Aus Rhizobiaceae sind bis jetzt zwei Insertionselemente beschrieben, ISR1 (Insertionselement aus R.lupini 1), das von Priefer (U. Priefer, 1980) charakterisiert wurde, und ISRM1 (Insertionselement aus R. meliloti 1), das von Ruvkun (G. B. Ruvkun et al., 1981) isoliert und charakterisiert wurde.

In dieser Arbeit sollte Vorkommen und Häufigkeit dieser IS-Elemente in den fünf Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae untersucht werden. Außerdem sollte versucht werden, weitere neue Rhizobium-spezifische Insertionselemente zu finden, um durch eine möglichst breit angelegte Analyse Aufklärung über die Funktion von IS-Elementen bei der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae zu erhalten.

C. Material und Methoden

1. Medien, Zusätze, Puffer und Chemikalien

1.1. Nährmedien

1.1.1. Nährmedien für E. coli Stämme

PA: Antibiotic Medium III (Oxoid) 17,5 g/l

RG: Bacto-Trypton (Oxoid) 10 g/l

Hefe-Extract (Oxoid) 1 g/l

NaCl 8 g/l

Glucose 1 g/l

RGMC: wie RG, zusätzlich 5mM $MgCl_2$ und 2mM $CaCl_2$

Festmedien : 15 g Bacto-Agar (Difco) pro Liter Flüssigmedium

1.1.2. Nährmedien für Rhizobienstämme

LL: Lab Lemco Broth (Oxoid) 8 g/l

NB: Nutrient Broth (Difco) 8 g/l

YMB: Yeast Mannitol Broth

Hefe-Extrakt 0,4 g/l

K_2HPO_4 0,5 g/l

NaCl 0,1 g/l

Mannit (getrennt autoklavieren) 10 g/l

$MgSO_4$ (" ") 0,2 g/l

MM: (Heumann, 1968) dieses Medium wurde mit Dextrin statt
Glucose verwendet

Festmedien: 15 g Bacto-Agar pro Liter Flüssigmedium

1.2. Zusätze zu Nährmedien

Antibiotikazusätze für E. coli - und Rhizobienmedien

Substanz	Abk.	Konz. für E.coli	für Rhizobien
		µg/ml	µg/ml
Ampicillin (Hoechst)	Ap	100	400
Kanamycin (Grünethal)	Km	25	30
Tetracyclin (Hoechst)	Tc	20	40
Streptomycin (Serva)	Sm	200	200
Neomycin (Serva)	Nm	100	100
Nalidixin (Serva)	Nx	100	100

1.3. Puffer und Lösungen

DNA-Puffer

TE: 1mM EDTA, 10mM Tris/HCl, pH 7,5 bzw. 8,0

TES: 5mM EDTA, 50mM Tris/HCl, 50 mM NaCl pH 8

TE-O: 20 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8

Verdünnungspuffer

PS: 8,5 g NaCl/l

PBS: NaCl 4 g/l

KH_2PO_4 3 g/l

Na_2HPO_4 7 g/l

Spaltungspuffer

Puffer für:	Tris	NaCl	MgCl_2	KCl	pH
<u>AluI</u>	6 mM	50 mM	6 mM	-	7,6
<u>BamHI</u>	6 mM	-	6 mM	-	7,4
<u>BglIII</u>	10 mM	50 mM	10 mM	-	7,5
<u>EcoRI</u>	10 mM	100 mM	10 mM	-	7,5
<u>EcoRV</u>	10 mM	100 mM	10 mM	-	7,5
<u>HaeIII</u>	6 mM	50 mM	6 mM	-	7,6
<u>HindIII</u>	10 mM	50 mM	10 mM	-	7,5
<u>PstI</u>	10 mM	50 mM	10 mM	-	7,5
<u>SmaI</u>	15 mM	-	6 mM	15 mM	8,5
<u>XhoI</u>	6 mM	-	6 mM	-	7,4

Elektrophoresepuffer

TA: Tris-Acetat Puffer

40 mM Tris, 10 mM Na-acetat, 1 mM EDTA

mit konz. Essigsäure auf pH 7,8

TB: Tris-Borat Puffer

90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

pH 8,2

Andere Puffer und Lösungen, z. B. für DNA-Isolierung und Southern Transfer werden im Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden aufgeführt.

1.4. Enzyme, Chemikalien und sonstiges Material

Restriktionsenzyme

AluI und Hae III: BRL, Neu Isenburg

EcoRI und XhoI : Dr. Rösch, Erlangen

alle übrigen Restriktionsenzyme wurden von Boehringer, Mannheim bezogen

Sonstige Enzyme

DNaseI: Serva, Heidelberg

RNase: Serva, Heidelberg

Pronase K: Serva, Heidelberg

DNA Polymerase: Boehringer, Mannheim

Lysozym: Serva, Heidelberg

Chemikalien und sonstiges Material

Agarose: Sigma, Taufkirchen

Polyvinylpyrrolidon: "

Bromphenolblau: Serva, Heidelberg

Caesiumchlorid: "

Cytochrom c: "

Ethidiumbromid: "

Kalbsthymus DNA: "

Sarcosyl NL 97: "

SDS:	Serva, Heidelberg
Triton X 100:	"
Typ MB1 Amberlite:	"
Visking Dialyseschlauch:	"
Formamid:	Fluka
Ficoll 400:	Pharmacia
^{32}P - α -dATP/CTP:	NEN
Nitrocellulosefilter für Kreuzungen:	Sartorius
Nitrocellulosefilter für Southern Transfer:	Schleicher und Schüll
Whatman 3MM Papier:	Whatman
Zellstoff, ungebleicht:	Klein, Erlangen
Elutip-d Minisäulen:	Schleicher und Schüll
Sephadex G 50 medium:	Pharmacia
Polaroid Typ 665 Film:	Lacher, Erlangen
Kodak X-Omat AR:	"
Verstärkerfolien Quanta II:	Dupont
Roentogen:	Tetenal, Hamburg
Superfix:	"
Alle nicht einzeln aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.	

2. Bakterienstämme und Plasmide

2.1. Bakterienstämme

E. coli Stämme

Stamm	wichtige genetische Markierungen	Herkunft
C-600	thi, thr, leu, lac ⁻ , suIII, ton A	Pühler, Bielefeld
CSH 52	thi, ara, Sm, Δ (lac, pro), F ⁻ , (ϕ 80 dlac), recA	Simon, Bielefeld
CSH 56	thi, ara, Nx, Δ (lac, pro), F ⁻	"
SH300	= C-600 (RP ₄), Ap, Km, Nm, Tc	Stammsmlg. Erl.
HB101	thi, thr, leu, recA, Sm, hsdR, hsdM	"

Rhizobienstämme

Stamm:	Herkunft
R. meliloti 2011	Dénarié, Versailles
R. meliloti 20-1	Stammsammlg., Erl.
R. meliloti MVII/1	"
R. meliloti E 9	Horn, Erl.
R. meliloti E10	"
R. leguminosarum 300	Beringer, Norwich
R. phaseoli DSM 30137	DSM, Göttingen
R. trifolii DSM 30141	"
R. japonicum CB1809	CSIRO, Australien
A. tumefaciens B 6	Phabagen Coll., Utrecht

Stämme des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae

alle folgenden Stämme wurden im Labor von Prof. Heumann isoliert.

Derivate von R. meliloti 20-1

Stamm	Zuordnung im Rhizobienschema
31-12	Klasse I, Minimaltyp
30-25	Klasse III, Nif-Typ
1-932	Klasse IV, car-Typ y
33-5	Klasse IV, car-Typ y, bacteroid bildend
4-20	Klasse V, car-Typ r
18-23	Klasse I, Agrobakterium Wildtyp

Derivate von R. trifolii

Stamm	Zuordnung im Rhizobienschema
31-18	Klasse I, Minimaltyp
32-6	Klasse II, Prowildtyp
30-36	Klasse III, Nif-Typ
1-937	Klasse IV, car-Typ y
4-16	Klasse V, car-Typ r
18-30	Klasse I, Agrobakterium Wildtyp
18-31	Klasse I, Agrobakterium Wildtyp

Weitere Schemastämme, die nur für Hybridisierungen verwendet wurden, werden nur bei dem entsprechenden Versuch aufgeführt.

2.2. Plasmide

Plasmid	Marker	Herkunft
RP ₄	Ap, Km, Nm, Tc, Inc P	Pühler, Bielefeld
Col E1	Colicin E1 und Immunität	Lotz, Erlangen
RSF 2124	= Col E1::Tn1, Ap	MPI, Berlin
Col E1::Tn1::ISR1	wie Col E1::Tn1, ISR1 In- sertion	Priefer, Bielefeld
pRmR3	pACYC 184 mit Fragment aus der R. mel. <u>nif</u> Region und Insertion von ISRm1	Ausubel, USA

3. Genetische Methoden

3.1. Plasmidtransfer durch Kreuzung

3.1.1. Schnellkreuzung

Diese Methode eignet sich gut zur Konstruktion von Plasmid tragenden Stämmen. Auf geeigneten Selektionsplatten, die nur das Wachstum von Rekombinanten erlauben, werden Einzelkolonien von Donor und Rezipient zueinander quergestrichen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37° C für E. coli Rezipienten, bzw. 30° C für Rhizobium sp. Rezipienten. Im Mischbereich der beiden Stämme erhält man Transkonjuganten, die über zwei Einzelkoloniepassagen(= Ausstreichen einer Einzelkolonie aus dem Mischbereich auf Selektivmedium, Inkubation über Nacht, und nochmaliges Ausstreichen einer Einzelkolonie von dieser

Platte) nachgereinigt, und auf die Plasmidmarker nachgetestet werden.

3.1.2. Plasmidtransfer durch Filterkreuzung

Durch Konjugation auf Nitrozellulosefiltern (NC- Filter) kann man die Transferrate signifikant erhöhen.

Diese Methode wurde für den Plasmidtransfer in die stark Schleim bildenden Rhizobienstämme verwendet.

Durchführung:

- NB Platten über Nacht bei 42° C austrocknen lassen
- je einen sterilen Membranfilter (Sartorius, Porengröße 0,45 µm) auflegen
- 200 µl Rezipient (OD₅₈₀ 0,6) auftragen
- Medium eintrocknen lassen
- 20 µl Donor (OD₅₈₀ 0,2) auftragen
- o.n. bei 37 bzw. 30° C inkubieren
- Filter in 5 ml sterilem NB abschwemmen
- Verdünnungsreihe anlegen
- geeignete Verdünnungsstufen auf Selektionsmedien ausspateln

3.2. Stressbedingungen

Die Stressbedingungen fördern die Umorganisation des Genoms von Rhizobienstämmen in die von Heumann definierten Klassen. Für die Zielsetzung dieser Arbeit wurden die Stressbedingungen von Heumann modifiziert. Da keine vollständige Umwandlung, sondern nur die Vorstufen gewünscht wurden ,wurden sie abgemildert und verkürzt.

Durchführung:

Von einer frischen Platte des zu untersuchenden Stammes wird eine Einzelkolonie in MM + Dextrin angeimpft und mehrere Wochen bei 30° C gerollert. Jede Woche wird eine Probe entnommen und eine Verdünnungsreihe ausplattiert. Von jedem Zeitwert werden 200 Einzelkolonien auf die entsprechenden Marker überstempelt und Mutanten isoliert.

4. DNA-Isolierung und Aufarbeitung

Bakterielle DNA wurde durch verschiedene Lyse-Methoden gewonnen, je nachdem ob Gesamt-DNA (= chromosomale- und Plasmid DNA), kleine oder große Plasmide isoliert werden sollten.

4.1. Isolierung von Gesamt-DNA

Für die Isolierung von Gesamt-DNA wurde eine modifizierte Sarcosyllyse verwendet, die keinen CsCl-Dichtegradientenlauf erfordert.

Die zu lysierenden Stämme werden dick auf einer geeigneten Platte über Nacht angezogen, und die Lyse wie folgt durchgeführt:

- Bakterien von einer halben Platte mit der Öse abkratzen und in 5 ml TES Puffer pH 8 resuspendieren
- 10 Min. bei 10 000 rpm und 4° C abzentrifugieren
- in 3 ml 20% Sucrose in TES pH 8 resuspendieren
- + 1 ml Lysozym/RNase 10/2 mg/ml
- 15 Min. in Eis stehen lassen

- + 1/10 Vol. 0,1% Pronase K (1h bei 56° C vorbehandelt)
- 90 Min. bei 37° C inkubieren (180 Min. bei Klasse V Stämmen)
- + 1 ml Sarcosyllsg. 10% in 0,25M EDTA (20% für Klasse V Stämme)
- leicht schütteln, bis die Suspension aufklart und viskös wird (30 Min. 65° C für Klasse V Stämme)
- + 5 ml Phenol, gesättigt mit TES pH 8,5
- 2-3 mal Scheren mit einer 10 ml Einmalspritze mit 0,9 mm Kanüle
- 10 Min. bei 10 000 rpm und 4° C abzentrifugieren
- obere, wässrige Phase abziehen
- + 5 ml Phenol
- kurz schütteln
- 10 Min. bei 10 000 rpm und 4° C abzentrifugieren
- wässrige Phase abziehen
- + 5 ml CIA (= Chloroform:Isoamylalkohol 24 ml + 1 ml)
- 10 Min. bei 10 000 rpm und 4° C abzentrifugieren
- wässrige Phase abziehen - CIA Schritt wiederholen
- ausgiebig dialysieren

4.2. Isolierung von Plasmid DNA über CsCl-Dichtegradienten

4.2.1. Lysemethoden

4.2.1.1. Sarcosyllyse

Bei dieser, nach Bazaral und Helinski (1968) abgewandelten Methode wird durch das Detergenz Sarcosyl die Zellmembran der Bakterien vollständig zerstört und der gesamte Zellinhalt

freigesetzt. Um im Dichtegradienten eine Überlagerung der Plasmidbande durch die chromosomale DNA zu verhindern, muß das Chromosom durch ausgiebiges Scheren in lineare Bruchstücke überführt werden. Außerdem muß die Menge der zu lysierenden Zellen relativ gering gehalten werden. Dieses Verfahren eignet sich vor allem für kleine Plasmide, die in hoher Kopienzahl vorliegen (multy copy Plasmide). Ab einem Molekulargewicht von 35 md - 40 md ist von dieser Methode abzuraten, da Plasmide dieser Größe beim Scheren zerstört werden könnten.

Vorschrift für 35 ml Stationärkultur

- Zellen 5 Min. bei 10 000 rpm abzentrifugieren
- 2 x waschen in TES Puffer pH 8
- Pellet resuspendieren in 0,75 ml 20% Sucrose in TES pH 8
- 15 Min. auf Eis stehen lassen
- + 0,25 ml Lysozym (10 mg/ml in H₂O)
- + 0,25 ml RNase (5 mg/ml in 50 mM Tris pH 8; 10 Min. bei 100°C vorbehandelt, um kontaminierende DNasen zu inaktivieren)
- 30 Min. bei 37°C unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln inkubieren
- + 0,3 ml Sarcosyllsg. (10% Sarcosyl in 0,25 mM EDTA pH 8)
- drehen, bis die Suspension aufklart
- das Lysat mit einer 2 ml Einmalspritze mit 0,9 mm Kanüle kräftig scheren, bis die Viskosität deutlich abnimmt
- + 4 ml TES pH 8
- 10 Min. 15 000 rpm 4°C (Entfernung von Zellbruchstücken)
- 5 ml Lysat pro Gradient, 0,2 ml EtBr 20 mg/ml

4.2.1.2. "cleared lysate" Methode

Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch das Detergenz Triton X 100 nur teilweise abgebaut. Durch diese schonende Behandlung bleibt die chromosomale DNA größtenteils an Membranbruchstücke gebunden und kann durch Zentrifugation sedimentiert werden. Der Überstand, das sog. "cleared lysate", enthält daher vorwiegend Plasmid DNA. Die weitgehende Abtrennung des Chromosoms erlaubt die Aufarbeitung größerer Zellmengen. Außerdem wird jegliches Scheren der Plasmid DNA vermieden. Diese Methode ist daher besonders zur Isolierung von größeren Plasmiden, wie z. B. RP4 geeignet, die nur in wenigen Kopien pro Zelle vorliegen (single copy Plasmide).

Vorschrift für 200 ml Stationärkultur

- Bakterien 10 Min. bei 10 000 rpm abzentrifugieren
- Pellet resuspendieren in 2 ml 20% Sucrose in 50 mM Tris pH 8
- 15 Min. auf Eis
- + 1 ml frisches Lysozym (10 mg/ml in 50 mM Tris pH 8)
- 15 Min. auf Eis, dabei vorsichtig schütteln
- + 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,5
- 15 Min. Eis, vorsichtig schütteln
- + 4,5 ml Triton X 100 Lsg. (1 ml 10% Triton X 100, 12,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,5, 5 ml 1 M Tris pH 8,5, 80 ml H₂O)
- 30 Min. auf Eis, gelegentlich vorsichtig schütteln
- Zellbruchstücke und chromosomale DNA 30 Min. bei 20 000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- 8 ml Überstand pro Gradient; 0,25 ml EtBr 15 mg/ml

4.2.1.3. Isolierung von Plasmid DNA nach Hansen und Olsen

Dieses nach Hansen und Olsen (1979), modifizierte Verfahren erlaubt die präparative Isolierung großer Plasmide aus Rhizobien. Durch einen SDS-Hitzeschritt werden die Plasmide aus ihrer Assoziation mit dem Chromosom gelöst. Die chromosomale DNA wird aus dem Überstand durch hohe Salzkonzentration ausgefällt. Nach Sedimentation der chromosomalen DNA wird die Plasmid DNA durch PEG gefällt und über einen CsCl/EtBr Gradienten von noch verbliebener chromosomaler DNA gereinigt. Da bei dieser Methode jegliches Scheren und starkes Schütteln vermieden wird, ist sie zur Isolierung von großen Rhizobienplasmiden in ccc-Form sehr gut geeignet.

Vorschrift für 350 ml Stationärkultur

- Bakterien 10 Min. bei 6 000rpm und 4°C abzentrifugieren
- in 50 ml 100 mM EDTA pH 8 waschen
- Pellet in 20 ml 25% Sucrose in TEO pH 8 resuspendieren
- in vorgekühlte, silikonisierte Erlenmeyerkolben (500 ml) füllen
- + 30 ml Lysozym (3 mg/ml in 50 mM Tris pH 8)
- 15 Min. auf Eis
- + 40 ml 250 mM EDTA pH 8
- 10 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen
- + 50 ml auf 65°C vorgewärmtes 15% SDS in TEO
- langsam bei 65° schütteln, bis das Lysat 65°C erreicht hat
- weitere 10 Min. vorsichtig bei 65°C bewegen
- Lysat auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- in JA14 Becher (Beckman) umfüllen
- + 50 ml NaCl, schnell mischen durch vorsichtiges Drehen

- o.n. in Eis stehen lassen
- 20 Min. bei 12 000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- Überstand im 500 ml Erlenmeyerkolben (silikonisiert)
geben
- + 0,32 Vol. PEG 6 000 (42% in 10 mM Phosphatpuffer pH 7)
- o. n. in Eis stehen lassen
- 20 Min. bei 4°C (Zentrifuge vorkühlen) und 4 000 rpm
im Ausschwingrotor (Beckman) abzentrifugieren
- Überstand abkippen und PEG-Reste mit Zellstoff entfernen
- Pellet in 8,5 ml TEO resuspendieren
- 8 ml Lysat pro Gradient; 0,3 ml EtBr 15 mg/ml

4.2.2. CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

Intercalierende Substanzen, wie der Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr), lagern sich in die DNA ein, und erniedrigen dadurch ihre Dichte. Dabei können sich in lineare DNA und oc-Plasmid DNA mehr Ethidiumbromidmoleküle einschieben, als in kovalent geschlossene ccc-Plasmid DNA, bei der die Intercalierung durch die Überdrehung der DNA Stränge sterisch behindert wird. Die ccc-DNA bandiert deshalb unterhalb der oc- und linearen Form im CsCl/EtBr Dichtegradienten.

Für die Herstellung der Gradienten wird 1 g CsCl pro ml Lysat eingewogen, und je nach Lyse (s. Lysevorschriften) eine entsprechende Menge EtBr zugegeben und in Polyallomer-Röhrchen gefüllt. Die Röhrchen werden mit den dazugehörigen Kappen verschlossen und dann bis zum Rand mit dünnflüssigem Paraffin aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgt im Ti 50 bzw. Ti 75 Rotor der Beckman Ultrazentrifuge L5-50 bei 34 000 rpm und 25°C für mindestens 40 h.

Nach der Zentrifugation werden die DNA Banden durch seitliche Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (360 nm) sichtbar gemacht. Die Plasmid DNA wird durch Anstechen des Röhrchens knapp oberhalb der Bande mit einer sterilen 1 ml Spritze mit 0,9 mm Kanüle abgezogen.

4.2.2.1. Isolierung von ccc-DNA

Für Hetero- und Homoduplexversuche ist es wichtig, die ccc-Form durch eine zweite Dichtegradientenzentrifugation anzureichern. Hierfür wird die Plasmid DNA aus mindestens zwei Gradienten vereinigt, mit CsCl-Lösung (1 g/ml in Te pH 8) auf 8 ml aufgefüllt und mit 0,3 ml EtBr (10 mg/ml) versetzt und bei gleichen Bedingungen, wie oben angegeben, nochmals zentrifugiert. Dabei erfolgt eine weitere Abtrennung von oc-Plasmiden, so daß die daraus resultierende Plasmidbande fast völlig frei von oc-Plasmiden ist.

4.3. Aufbereitung der DNA aus CsCl-Dichtegradienten

4.3.1. EtBr-Extraktion

Durch mehrfaches, vorsichtiges Ausschütteln mit gleichem Volumen Isoamylalkohol oder Isopropanol (90%) wird das EtBr aus den abgezogenen DNA-Fraktionen entfernt. Bei großen Rhizobienplasmiden wird dieser Schritt weggelassen, um die Bildung von Bruchstücken zu vermeiden. Bei der anschließenden Phenolisierung wird gleichzeitig das EtBr mit extrahiert.

4.3.2. Dialyse

Zur Entfernung des CsCl wird die DNA in Dialyseschläuche, die zuvor in TE Puffer autoklaviert wurden, gefüllt, und gegen TE Puffer pH 8 bei 4°C dialysiert. Der Dialysepuffer wird dabei dreimal jeweils nach einer Stunde gewechselt. DNA Proben, die noch EtBr enthalten (große Rhizobienplasmide), müssen im Dunkeln dialysiert werden. Nach Gesamt-DNA Isolierung findet der Pufferwechsel fünfmal nach jeweils vier Stunden statt.

4.3.3. Konzentrierung

Zur Konzentrierung der DNA Lösung werden die Dialyseschläuche nach dem letzten Dialyseschritt für 30 - 60 Min. auf PEG 40 000 gelegt. Vor Entnahme der DNA Proben muß das PEG sorgfältig von den Dialyseschläuchen entfernt werden. Sie werden gründlich mit H₂O dest. abgewaschen und nochmals 30

Min. gegen Tris 10 mM pH 8 dialysiert.

4.3.4. Deproteinisierung

Zur Extraktion von Proteinen werden die DNA Proben mit TE Puffer pH 8,5 gesättigtem Phenol ausgeschüttelt. Nach 5 Minuten Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge wird die obere, wässrige Phase vorsichtig abgezogen. Stellt man nach der Zentrifugation eine starke Interphase fest, wird der Vorgang wiederholt.

Phenolrückstände werden durch Ätherextraktion und anschließende Dialyse oder Äthanol-fällung entfernt..

4.3.5. Äthanol-fällung von DNA

Die DNA Proben werden mit 1/10 Vol. 3 M Na-acetat versetzt und mit 3 Vol. 96% Alkohol aufgefüllt. Die DNA wird entweder bei -20°C über Nacht oder für 15 - 30 Min. bei -85°C gefällt. Danach wird die DNA 5 Min. in der Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird möglichst quantitativ abgezogen und die Pellets unter Vakuum getrocknet. Anschließend wird die DNA in gewünschtem Volumen 10 mM Tris pH 8 oder sterilem H₂O dest. 20 Min. bei 37°C resuspendiert.

4.3.6. Reinigung von DNA über Elutip-d Minisäulen

Eine Reinigung von DNA Proben über Elutip-d Minisäulen (Schleicher und Schüll) empfiehlt sich für DNA, die für Hetero- und Homoduplexversuche im Elektronenmikroskop eingesetzt werden soll, und für Restriktionsfragmente, die aus dem Agarosegel reisoliert wurden und radioaktiv markiert werden sollen.

Für die Elution werden zwei Pufferlösungen benötigt:

1. lsb (low salt buffer): 0,2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3-7,5, 1,0 mM EDTA
2. hsb (high salt buffer): 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3-7,5, 1,0 mM EDTA

Die DNA sollte in lsb oder einem ähnlichen Puffer vorliegen. Die Elution wird genau nach der mitgelieferten Vorschrift von Schleicher und Schüll durchgeführt.

4.4. Schnellverfahren zur Plasmidisolierung

Diese, nach Ish-Horwicz (1981) modifizierte, Methode dient zur schnellen Plasmidisolierung ohne CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Die resultierende Plasmid DNA reicht gewöhnlich für ein bis zwei Restriktionsenzymspaltungen.

Durchführung:

- die Stämme werden über Nacht selektiv in 1,5 ml Medium angezogen
- abzentrifugieren in der Eppendorf Tischzentrifuge
- Pellet homogen in 100 µl 50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM CDTA + 1mg/ml Lysozym (frisch zugeben) resuspendieren

- 5 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- + 200 µl 0,2 N NaOH, 1% SDS
- kurz mischen, 5 Min. in Eis stellen
- + 150 µl 5 M Ka-acetat pH 4,8
- kurz mischen, 5 Min. Eis
- 5 Min. abzentrifugieren (Sedimentation der chromosomalen DNA)
- Überstand (Plasmid DNA) vorsichtig abziehen
- + 200 µl Phenol/CHCl₃ (Denaturieren der Proteine), kurz mischen, abzentrifugieren
- obere wässrige Phase vorsichtig abziehen
- + 300 µl Isopropanol (90%), gut mischen, 3 Min. RT
- 5 Min. abzentrifugieren, Isopropanol mit steriler Spritze abziehen
- Pellet mit 1 ml 70% Äthanol waschen, 10 Min. stehen lassen
- abzentrifugieren, restliches Äthanol entfernen
- Pellet trocknen
- Pellet in 50 µl TE Puffer lösen, 5 µl Spaltpuffer (10x) zugeben und 1 µl RNase (5 mg/ml in 50 mM Tris pH 8, DNase inaktiviert), 30 Min. 37°C
- gewünschtes Enzym in entsprechender Menge zugeben

4.5. Darstellung von Plasmiden durch Lyse in den Agarosegeltaschen

Diese Methode wurde von Eckhardt et al. (1978) entwickelt, und von Simon, Bielefeld, modifiziert. Die Bakterien werden dabei direkt in den Agarosegeltaschen lysiert. Durch die sehr schonende Aufarbeitungsweise wird auch die Darstellung

von Plasmiden, die auf Grund ihrer Größe nicht mehr präparativ isolierbar sind (z.B. Megaplasme von Rhizobien), ermöglicht.

Durchführung:

- Anzucht der Bakterien über Nacht in geeignetem Medium
- ca. 5×10^7 Zellen pro Tasche einsetzen
- entsprechende Menge Übernachtskultur abzentrifugieren in der Eppendorf Tischzentrifuge
- stark schleimbildende Bakterien werden einmal mit 250 μ l 0,2% Sarcosyl in Boratpuffer gewaschen
- 5 Min. abzentrifugieren, Überstand abkippen und restlichen Überstand sorgfältig mit einer Spritze entfernen
- in 20 μ l Lösung 1 resuspendieren
- in mit Puffer gefüllte Geltaschen eines vertikalen 0,9% Agarosegels auftragen
- vorsichtig mit ca. 50 μ l Lösung 2 überschichten
- 30 Min. bei 2 mA laufen lassen, bis die Lösung aufklart
- 3h bei 100V weiterlaufen lassen

Lösung 1: 20% Sucrose, 10% Ficoll 400, 1 unit RNase/ml
(10 μ l einer Stammlösung 10 mg/ml, DNase inaktiviert)
immer frisches Lysozym 1 mg/ml zugeben!

Lösung 2: 5% Sucrose, 1% SDS, 0,25 mg/ml Bromphenolblau

5. Dichtebestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge

Je nach Konzentration werden 10 - 30 μ l Plasmid DNA mit 2 μ l Referenz DNA (hier *Micrococcus lysodeicticus* DNA, Dichte : 1,7308 g/ml) mit TE Puffer auf 433 μ l verdünnt und darin 0,567 g CsCl (suprapur) gelöst (Eingangsdichte 1,71 g/ml). Für die Referenzlösung werden jeweils 0,567 g CsCl in 433 μ l TE Puffer gelöst. Das Gradientenvolumen beträgt 400 μ l. Die so erhaltenen Proben werden in Doppelsektorzellen (Kel F Mittelstück 12 mm) eines An-F-Ti Rotors der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Modell E) zum Gleichgewicht zentrifugiert bei 44 000 rpm, 25°C, mindestens 20h. Die DNA Dichteverteilung wird mit einem photoelektrischen Scanner (Beckman) und einem externen 10" Recorder (Beckman) aufgenommen. Aus der bekannten Dichte der eingesetzten Referenz DNA kann nach der Gleichung von Ifft (1961) die Dichte der unbekannten DNA bestimmt werden.

6. Restriktionsanalyse

6.1. Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die zur Spaltung mit Restriktionsendonucleasen einzusetzende DNA Menge richtet sich nach der Konzentration der DNA Lösung und nach der Anzahl der entstehenden Fragmente. Im Normalfall werden 0,5 - 1 μ g DNA pro Spaltung eingesetzt. Die benötigte Enzymmenge wurde den Angaben des Herstellers entnommen. Bei am Institut isolierten Enzymen wurde sie durch Spaltung von Lambda DNA mit verschiedenen Enzymverdünnungen ermittelt. Die Pufferbedingungen für die jeweiligen Restriktionsenzyme

wurden mit entsprechenden 10 x Puffern eingestellt.

Bei Plasmiden, die nach dem Schnellverfahren isoliert wurden, und bei Gesamt DNA wurde zusätzlich 1/10 Vol. 100 mM $MgCl_2$ zugefügt.

Die Inkubation erfolgte für Plasmid DNA 1h bei 37°C bzw. 22°C für SmaI Spaltungen, und 2h bei Gesamt DNA Spaltungen.

Doppelspaltungen wurden gleichzeitig in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer (meistens Hind III Puffer) durchgeführt.

Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung (11 g Sucrose, 9 ml 0,1 M EDTA, 5 mg Bromphenolblau) gestoppt.

6.2. Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden vertikale und horizontale Elektrophoresekammern verwendet. Gespaltene DNA Proben wurden in Tris-Acetat Gelen aufgetrennt.

Agarosekonzentration, Spannung und Laufzeit sind abhängig von der Fragmentgröße und der gewünschten Auftrennung.

Die entsprechenden Laufbedingungen sind den Legenden der einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Nach der Elektrophorese werden die Gele etwa 30 Min. in einer EtBr Lösung (1 μg /ml) gefärbt und im UV Durchlicht (254 nm, Transilluminator von Hormuth und Vetter) fotografiert (Polaroid Land Camera MP4, mit Polaroidfilm Typ 665, Orangefilter).

Gleichzeitig wird ein Lineal mit fotografiert, um später 1:1 Vergrößerungen der Gelbilder mit den dazugehörigen Autoradiografien vergleichen zu können.

6.3. Molekulargewichtsbestimmung der Fragmente

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente in der Gelelektrophorese ist direkt abhängig von ihrem Molekulargewicht. Die Länge eines unbekannten Fragments kann deshalb durch Vergleich mit der Laufstrecke eines bekannten Fragmentes errechnet werden. Deshalb wird auf jedes Gel ein Längenstandard mit aufgetragen. Durch logarithmische Auftragung der Wanderungstrecke gegen das Molekulargewicht wird für jedes Gel eine Eichkurve aufgestellt und daraus die Größe der unbekannten Fragmente bestimmt. In dieser Arbeit wurden folgende Längenstandards verwendet: Lambda DNA, geschnitten mit EcoRI, HindIII und EcoRI + HindIII, sowie replikative DNA des Phagen ϕ X174 mit HaeIII geschnitten. Das Molekulargewicht der Fragmente beträgt in kb:

Lambda x <u>EcoRI</u>	Lambda x <u>HindIII</u>	Lambda x E+H	ϕ X174 x <u>HaeIII</u>
1. 21,23	1. 23,13	1. 21,7	1. 1,35
2. 7,42	2. 9,42	2. 5,15	2. 1,08
3. 5,80	3. 6,56	3. 5,0	3. 0,87
4. 5,64	4. 4,37	4. 4,27	4. 0,60
5. 4,88	5. 2,32	5. 3,48	5. 0,31
6. 3,53	6. 2,03	6. 1,98	6a. 0,28
	7. 0,56	7. 1,9	6b. 0,27
	8. 0,13	8. 1,59	7. 0,23
		9. 1,37	8. 0,19
		10. 0,94	9. 0,12
		11. 0,83	10. 0,072
		12. 0,56	
		13. 0,14	

7. Elektronenmikroskopie

7.1. DNA Präparationsmethoden

7.1.1. Dropletverfahren

Diese Methode wird für alle Routinepräparationen von DNA verwendet. Sie ist eine Modifikation der von Kleinschmidt und Zahn (1959) vorgestellten Technik, und basiert auf der Fähigkeit des basischen Proteins Cytochrom c, durch Denaturierung an der Phasengrenze Luft/Wasser einen Monolayer zu bilden. Dieser Monolayer adsorbiert, entfaltet und stabilisiert doppelsträngige DNA.

Durchführung:

Herstellung einer Stammlösung aus:

2,56 ml H₂O bidest

0,3 ml 2 M Ammoniumacetat

8 µl cyt. c (1 mg/ml)

0,25 ml dieser Stammlösung werden mit 1 - 5 µl DNA Lösung versetzt. Von dieser Mischung werden kleine Tropfen (ca. 50-100 µl) auf eine hydrophobe Oberfläche gesetzt (Plastikpetrischale). Nach einer Stunde wird der Cytochrom c Film mit einem mit Parlodion beschichteten Kupfernetz abgetupft.

Kontrastierung

Zur positiven Kontrastierung wird das Netz 30 sec in eine Uranylacetatlösung (Stammlösung: 5×10^{-3} M Uranylacetat in 0,05 M HCl, frisch verdünnt 1 : 100 in 90% Äthanol) getaucht, anschließend kurz in 90% Äthanol gespült und an der Luft getrocknet.

Die Netze werden dann bei einem Winkel von 6° und einer Entfernung von 4,5 cm mit Pt/Ir (80/20) Draht (0,1 mm) rotationsbedampft (Bedampfungsanlage JEOL JEE 4B, Japan; 1 Min. 30 V). Zur Stabilisierung wird anschließend noch etwas Kohle aufgedampft.

7.1.2. Spreitung von DNA

Zur Darstellung einzelsträngiger DNA ist die Formamidspreitung besser geeignet, als das Dropletverfahren. Die Entfaltung der flexiblen, klebrigen einzelsträngigen DNA wird dabei durch die Zugabe von Formamid, das die Wasserstoffbrückenbindung innerhalb eines Einzelstrangs vermindert, erreicht. Man verwendet ein zwei Phasen System, bestehend aus Ober- und Unterphase. Die Formamidkonzentration der Oberphase ist abhängig vom GC-Gehalt der DNA. Die Unterphase enthält eine geringere Formamidkonzentration (etwa 75% der Oberphase). Je größer die Differenz der Formamidkonzentration zwischen der Ober- und Unterphase ist, desto größer wird auch der Spreitungsfleck auf der Unterphase und umso besser ist die Entfaltung der DNA Moleküle.

7.1.2.1. Tris-Formamid Spreitung

Das für die Oberphase verwendete Formamid (purissimum, Fluka) wird vorher zweimal durch Einfrieren rekristallisiert. Danach sollte die OD_{270} kleiner als 0,2 sein. Ober- und Unterphase werden immer frisch angesetzt.

Oberphase:

50% Formamid, rekristallisiert

10 mM EDTA

0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Für die Spreitung werden 1-5 μ l DNA in 20 μ l dieser Lösung angesetzt, und 0,4 μ l cyt c (5 mg in H_2O dest.) zugegeben.

Unterphase:

30% Formamid (hier wird nicht rekristallisiertes FA verwendet)

1 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5-8,7

0,5 ml 0,2 M EDTA

ad 100 ml mit H_2O bidest.

Präparation:

Man läßt die DNA über eine schräge Glasrinne auf die Oberfläche der Unterphase fließen. Dabei wird das vorher auf die Unterphase gestreute Talkumpuder verdrängt und so der Ort sichtbar gemacht, an dem sich ein DNA-Cytochrom c Film ausgebildet hat. Dieser Film wird nach 30 sec mit einem Parlodion beschichteten Kupfernetz abgenommen und wie vorher beschrieben kontrastiert und bedampft.

7.1.2.2. Carbonatspreitung

Dieses Verfahren wurde von R. Lurz (MPI, Berlin) übernommen. Es erleichtert die Unterscheidung von Einzel- und Doppelstrang, da die DNA nicht so stark verdickt wird, wie bei der Tris-Formamid Spreitung. Man muß jedoch eine höhere DNA Konzentration einsetzen, da auf Wasser gespreitet wird. Dies führt zu einer stärkeren Ausbreitung des Spreitungsflecks und somit zu einer größeren Verdünnung der DNA.

Durchführung:

Carbonatpuffer (immer frisch ansetzen)

400 µl H₂O bidest.

40 µl 1 M Na₂CO₃

20 µl 0,2 M EDTA

pH ca. 10,5

auf Eis aufbewahren

Oberphase:

2 µl Carbonatpuffer

5 µl Formamid (rekristallisiert)

2 µl DNA (10 µg/ml)

1 µl cyt c (1 mg/ml)

Die Unterphase wird in eine Teflonschale, die in etwa die Größe einer Petrischale hat, gefüllt und etwas Talkum aufgestreut. Mit einer Eppendorf Pipette werden dann jeweils 5 µl des Ansatzes aufgetropft. Der Film wird nach 30 sec abgenommen und wie vorher beschrieben kontrastiert und bedampft.

7.2. Längenmessung von Plasmid DNA

Die Plasmid DNA wurde für die Längenmessung nach dem Drop-letverfahren präpariert. Von jedem Plasmid wurden mindestens 20 Moleküle im Elektronenmikroskop (Philips 400) fotografiert.

Die Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden über einen Projektor vergrößert und die Kontourlänge der Plasmide mit einem Längenmessgerät ermittelt. Den Umrechnungsfaktor für die wahre Länge der Plasmide liefert entweder ein externer Gitterstandard, der bei gleicher Vergrößerung mitfotografiert wird, oder ein interner Standard. Ein interner Standard ist bei der Längenmessung von Plasmid DNA vorzuziehen, da die Länge eines Moleküls nicht nur durch Meß- und Vergrößerungsfehler beeinflusst wird. Eine wesentliche Rolle spielen auch die Beschaffenheit des Parlodionfilms und Dehnungseffekte, die bei der Präparation auf die DNA einwirken. Als interne Standards werden kleine Plasmide bekannter Länge wie pBR322 (4,36 kb) oder ColE1 (6,34 kb) verwendet. Sie werden bei der Präparation den DNA Proben zugesetzt. In dieser Arbeit wurde ColE1 DNA verwendet.

7.3. Heteroduplexanalyse

Diese Technik, die von Davis und Davidson (1968) entwickelt wurde, dient zur Bestimmung des Homologiegrades von zwei verschiedenen DNAs. Die zu untersuchenden DNAs werden gemischt, denaturiert, renaturiert und entweder nach der Tris-Formamid- oder der Carbonatmethode gespreitet. Bei der Renaturierung entstehen Hybride mit doppel- und einzelsträngigen Regionen, die dann elektronenmikroskopisch ausgewertet

werden.

Die DNA sollte für diese Analyse sehr sauber sein. Plasmid DNA sollte möglichst nur in ccc Form vorliegen. Die hier verwendete DNA wurde über zwei aufeinanderfolgende CsCl-Dichtegradientenläufe präpariert, und nach der Dialyse noch über Elutip-d Minisäulen gereinigt. Die DNA Konzentration sollte wenigstens 10 µg/ml betragen. Die zu untersuchenden DNAs sollten im Verhältnis 1:1 zusammengegeben werden, um eine optimale Ausbeute an Heteroduplices zu erhalten.

Durchführung

je 1,5 µl DNA

1 µl 1 M Phosphatpuffer pH 7

5 µl Formamid (rekrist.)

1,5 Min. bei 100°C im Wasserbad erhitzen

+ 1 µl 2 M NaClO₄

2h im Wasserbad bei 40°C renaturieren lassen

2 µl entnehmen und die Oberphase je nach der gewünschten Spreitung ansetzen. Für die Tris-Formamid Spreitung werden 10 µl Formamid (rekrist.), 8 µl 1 mM EDTA und 0,4 µl cyt c (5 mg/ml) zugegeben. Für die Carbonatspreitung wird die auf S. 36 angegebene Oberphase verwendet. Der so eingeführte Verdünnungsschritt führt zu einer Verbesserung der Einzelstrangpräparation.

7.4. Homoduplexexperiment: Suche nach invertierten Sequenzen

Das Homoduplexexperiment dient zur Erkennung von invertierten Sequenzen, z. B. IS-Elementen oder Transposonen, die bei diesem Versuch im Elektronenmikroskop eine charakteristische Struktur erkennen lassen. Ansatz, Denaturierung und Renaturierung erfolgen wie im Heteroduplexverfahren, aber nur mit einer einzigen Plasmidspezies.

Die Renaturierung wird zu zwei verschiedenen Zeiten unterbrochen. Einmal nach 5 Min. und einmal nach 30 Min. Die kurze Renaturierungsdauer verhindert das Zusammengehen der Elternstränge. Es können nur invertierte Sequenzen innerhalb eines Stranges renaturieren (Intrastrang-Renaturierung). Längere Renaturierung erlaubt die Paarung der Elternstränge nach Hybridisierung der invertierten Sequenzen (Interstrang-Renaturierung). Es entstehen Homoduplices.

Erkennt man nach diesem zweiten Renaturierungsschritt im Elektronenmikroskop herausragende Schleifen (loops), die keine völlige Hybridisierung der beiden Stränge zeigen, hat man einen sicheren Hinweis für das Vorhandensein von invertierten Sequenzen. Solche Schleifen werden auch als Rückfaltungsstrukturen bezeichnet. Findet man Homoduplices, die diese Strukturen aufweisen, untersucht man die Moleküle nach dem 5 Min. Renaturierungsschritt. Sie sind zur Bestimmung der Länge der invertierten Sequenzen und des dazwischen liegenden DNA Stücks besser geeignet, da die durch die Interstrang-Renaturierung hervorgerufene Verknäulung der Loops entfällt. Handelt es sich um sehr kurze invertierte Sequenzen, kann man sie im Einzelstrangversuch oft nicht von normalen Einzelstrangüberkreuzungen unterscheiden. Der

Doppelstrangversuch ist daher nötig, um das Vorhandensein von invertierten Sequenzen durch das Auftreten der charakteristischen Rückfaltungsstrukturen zu beweisen.

8. Southern Transfer und DNA-DNA Hybridisierung

Die von Southern (1975) entwickelte Filterhybridisierungsmethode enthält folgende Schritte:

- Auftrennung der DNA Fragmente oder ganzer Plasmide im Agarosegel
- alkalische Denaturierung der DNA im Gel
- Neutralisierung der DNA
- Übertragung der DNA auf ein für die Hybridisierung geeignetes Trägermaterial=Nitrocellulosefilter (NC-Filter)
= blotten
- Hitzefixierung der einzelsträngigen DNA auf das NC-Filter
- Hybridisierung der DNA auf dem NC-Filter mit einer radioaktiv markierten Test DNA

Enthält die zu untersuchende DNA die gleiche oder eine sehr ähnliche Sequenz, wie die radioaktive Probe, bindet die radioaktive DNA an die entsprechende Bande. Über Autoradiografie kann dann das Fragment, das die gesuchte Sequenz trägt identifiziert werden.

8.1. Southern Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter

Das Gel muß vor der alkalischen Denaturierung für den Southerntransfer unterschiedlich vorbehandelt werden, je nachdem, ob man ganze Plasmide oder Restriktionsfragmente transferieren will.

Plasmide sind zu groß, um ohne Vorbehandlung aus dem Gel transferiert werden zu können. Die Plasmid DNA muß zuerst im Gel zerkleinert werden. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten. Erstens, die Erzeugung von Brüchen durch UV-Bestrahlung¹, zweitens, die Behandlung mit 250 mM HCl, was zu einer Depurinisierung führt. Bei kleineren Plasmiden genügt es, eine dieser Methoden anzuwenden, bei Megaplasmiden müssen beide Verfahren kombiniert werden.

Sind die zu transferierenden Restriktionsfragmente relativ groß (größer als 10 -15 kb), empfiehlt es sich, auch hier entweder UV-Bestrahlung oder HCl Behandlung durchzuführen. In dieser Arbeit wurde die UV-Bestrahlung vorgezogen, da hierbei spezifisch nur die großen Fragmente bestrahlt und die kleinen Fragmente abgedeckt werden können.

Nach der Vorbehandlung wird das Gel zur alkalischen Denaturierung der DNA Fragmente 20 Min. in 1 M KOH gelegt und anschließend mindestens 1h in 1 M Tris pH 7,4 und 1,5 M NaCl neutralisiert. Der pH-Wert des Gels sollte danach nicht höher als 9 sein, da sonst das NC-Filter nach dem Transfer gelb und brüchig wird.

Dann wird für den DNA Transfer ein Blotstapel aufgebaut wie folgt:

- Wanne mit 20 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat) füllen und eine Glasplatte darüber legen
- 3 Lagen Whatman 3 MM Papier (etwas größer als das Gel) in 20 x SSC einweichen und über die Glasplatte legen (Luftblasen entfernen)
- Gel auf das Whatman 3 MM Papier legen

- um das Gel Parafilmstreifen anpassen, so daß das SSC nur durch das Gel gesaugt werden kann
- auf das Gel wird das genau auf Gelgröße zugeschnittene, in H_2O und 20 x SSC vorgeweichte NC-Filter gelegt (es dürfen keine Luftblasen zwischen Gel und NC-Filter bleiben)
- 4 Lagen trockenes Whatman 3 MM Papier (Gelgröße) darauflegen
- Stapel aus saugfähigem Papier (z. B. ungebleichter Zellstoff) auflegen
- Glasplatte auflegen und ca. 1kg Gewicht daraufstellen
- der Transfer erfolgt über Nacht

Danach wird das Gel, das jetzt nur noch eine papierdünne Membran ist, vom NC-Filter gelöst, und zur Kontrolle der Qualität des Transfers mehrere Stunden nachgefärbt.

Das NC-Filter erhält eine Richtungsmarkierung, wird kurz in 3 x SSC gewaschen und dann zur Fixierung der DNA 4 h bei 80°C inkubiert. Danach können die Filter für mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

8.2. Nick-Translation

Die Methode der Nick-Translation von Rigby et al. (1977) dient dazu, DNA in vitro radioaktiv zu markieren.

Um die Nick-Translation zu ermöglichen, werden mit sehr geringer Konzentration an DNase I Einzelstrangbrüche (nicks) über die gesamte Länge der DNA statistisch verteilt. Zur Reparatursynthese wird DNA Polymerase I zugegeben, die durch ihre Polymerase- und 5' Exonucleaseaktivität den Einbau radioaktiver Triphosphate, wie z.B.

32 -P-~~A~~dATP, ermöglicht. Im Reaktionsverlauf baut zunächst die 5'- Exonucleaseaktivität vom freien 5' Phosphatende eines nicks weitere Nucleotide ab. Es entsteht eine Lücke, die dann von der Polymerasefunktion des Enzyms durch sequenzgetreue Anheftung von Nucleotiden an das 3'-OH Ende wieder geschlossen wird. Dabei werden die angebotenen radioaktiven Nucleotide eingebaut. Man erreicht eine spezifische Aktivität von bis zu 10^8 cpm/ μ g DNA.

Durchführung der Nick-Translation

Je nach Anzahl der zu hybridisierenden Filter wurden 1-4 μ g DNA in der Lyophile eingeengt und folgender Reaktionsansatz dazupipettiert:

- +2,5 μ l 2mM CTP
- +2,5 μ l 2mM TTP
- +2,5 μ l 2mM GTP
- +5,0 μ l 32 -P-~~A~~-dATP (= 5 μ Ci)
- +12,5 μ l H₂O dest.
- +1,5 μ l 1 M Tris pH 7,5
- +1 μ l 1 M MgCl₂
- +3 μ l DNase Verdünnung*
- +5 μ l DNA Polymerase I
- 2 h bei 14,5°C inkubieren

*Ansatz der DNase Verdünnung:

1 mg/ml DNaseI wird in 0,01 M Tris pH 7,5, 0,01 M CaCl₂, 0,01 M MgSO₄ gelöst und in 50 μ l Portionen bei -20°C eingefroren.

Für die Nick-Translation wird eine Portion aufgetaut und 1:10 000 in 10 mM Tris pH 7,5 , 5 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml BSA verdünnt.

Nach der Nick-Translation werden nicht eingebaute Triphosphate durch Zentrifugation über eine Sephadex G50 Minisäule von der markierten DNA abgetrennt.

Durchführung:

- 5 ml Spritze mit silikonisierter, steriler Glaswolle stopfen und ein Stück Schlauch am Auslauf befestigen
- mit Sephadex G50 (gequollen in TNE Puffer: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl) auffüllen
- Spritze in 30 ml Corexglas hängen
- 2 Min. bei 2 500 rpm und Raumtemperatur abzentrifugieren
- Zentrifugat abkippen, Plastikröhrchen zum Auffangen der radioaktiv markierten DNA in das Corexglas stellen, und die Spritze so einhängen, daß der Schlauch ins Plastikröhrchen reicht
- Nick-Translationsansatz + 300 μ l TNE Puffer auftragen
- 4 Min. bei 2 600 rpm und Raumtemperatur abzentrifugieren
- 3-5 μ l der radioaktiv markierten DNA-Lsg. mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit (4 g PPO + 0,2 g POPOP in 660 ml lösen, dann 330 ml Triton X 100 zugeben) im Phosphor-kanal des Beckman Szintillationszählers (LS 7 500) auszählen und Einbaurate bestimmen

Alle radioaktiven Markierungen und Hybridisierungen wurden im Isotopenlabor des Instituts für klinische Virologie

durchgeführt.

8.3. Hybridisierungsbedingungen

Vor der Hybridisierung müssen die noch freien Bindungsstellen für DNA auf dem NC-Filter abgesättigt werden. Hierfür werden die mit H_2O benetzten Filter zuerst 2 h in 10 x Denhardt (1 x = 0,02% Ficoll 400, 0,02% BSA, 0,02% Polyvinylpyrrolidon) in 3 x SSC bei 68°C vorinkubiert. Dann wird 1 h bei 68°C in Hybridisierungspuffer mit denaturierter Kalbsthymus DNA der folgenden Zusammensetzung weiterinkubiert:

- 180 ml 3 x SSC
- 20 ml 100 x Denhardt in 3 x SSC
- 2 ml 10% Natriumpyrophosphat
- 2 ml 10% SDS
- 6 ml denaturierte Kalbsthymus DNA

Denaturierung der Kalbsthymus DNA:

- 2 ml DNA-Lsg. (5 mg/ml in 0,5 x SSC)
- + 1 ml 1 N NaOH
- kurz aufkochen
- in Eis abschrecken
- + 2 ml 1 M Tris pH 7,4
- + 1 ml 1 N HCl

Für die eigentliche Hybridisierung wird zuerst die optimale Hybridisierungstemperatur ermittelt. Sie ist abhängig

vom GC-Gehalt der zu hybridisierenden DNA und dem Salzgehalt der Hybridisierungslösung und wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{opt.}} = T_m - 25^{\circ}\text{C} \quad (= 18\% \text{ mismatch})$$

(T_m = Schmelzpunkt der DNA)

$$T_m = 16,6 \log \text{ Mol SSC} + 0,41 (\text{ G+C in } \%) + 81,5$$

Je $1,4^{\circ}\text{C}$ unter dem Schmelzpunkt entsprechen 1% mismatch. Wählt man eine Hybridisierungstemperatur von $T_{\text{opt.}}$ und darüber spricht man von stringenten Bedingungen, weil nur sehr wenig falsche Basenpaarung(= mismatch) zugelassen wird (Southern, 1979). Bei einer Hybridisierungstemperatur unter $T_{\text{opt.}}$ hat man dann entsprechend relaxierende Bedingungen. Die Wahl der Hybridisierungsbedingungen ist abhängig vom Versuchsziel. Die genauen Hybridisierungsbedingungen sind den jeweiligen Legenden zu entnehmen. In dieser Arbeit wurde meistens mit Formamid hybridisiert. Formamid senkt den Schmelzpunkt der DNA und damit auch die Hybridisierungstemperatur. 1% Formamid senkt T_m um $0,72^{\circ}\text{C}$ (Maniatis et al., 1982). Formamid steigert außerdem die Stringenz der Versuchsbedingungen, da es nur spezifische Hybridisierung zulässt (Southern, 1979). Das Formamid wird vor der Hybridisierung 3 h mit Amberlite deionisiert. War der radioaktive Einbau sehr niedrig, wurde 10% Dextran-sulfat zur Hybridisierungslsg. gegeben. Dextransulfat verstärkt die Hybridisierung um das 10- 100 fache (Wahl et al., 1979).

Die Menge der anzusetzenden Hybridisierungslsg. ist abhängig von der Größe des NC-Filters. Man nimmt $50-100\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

In dieser Arbeit wurden wahlweise folgende Hybridisierungsansätze verwendet:

1. Ansatz ohne Formamid (FA) und Dextransulfat (DS):

(es werden die jeweiligen Endkonzentrationen angegeben)

3 x SSC

0,1% SDS

0,1% Na- Pyrophosphat

10 x Denhardt

50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ kalte Kalbsthymus DNA

radioaktiv markierte DNA

2. Ansatz mit Formamid ohne Dextransulfat:

50% FA, deionisiert

5 x SSC

1 x Denhardt

0,1% Na-Pyrophosphat

50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ kalte Kalbsthymus DNA

radioaktiv markierte DNA

3. Ansatz mit Formamid und Dextransulfat:

50% FA, deion.

3 x SSC

1 x Denhardt

0,1% Na-Pyrophosphat

10% Dextransulfat in 3 x SSC

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kalte Kalbsthymus DNA

Die Denaturierung von kalter und radioaktiv markierter DNA erfolgt durch 10 Min. Kochen des gesamten Hybridisierungsansatzes.

- Die NC-Filter werden nach der Vorinkubation luftblasenfrei in Folienschlauch eingeschweißt, und die Hybridisierungslösung mit einer 20 ml Einmalspritze und 1 mm Kanüle injiziert. Die Einstichstelle wird mit dem Schweißgerät wieder zugeschweißt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht, am Besten unter sanftem Schütteln, bei der gewünschten Temperatur.

8.4. Waschbedingungen und Autoradiografie

Zur Ablösung unspezifisch gebundener, radioaktiver DNA werden die NC-Filter ausgiebig in einem Waschpuffer mit absteigender SSC Konzentration wie folgt, gewaschen:

<u>Lösung 1</u>	<u>Lösung 2</u>	<u>Lösung 3</u>
2 x SSC	1 x SSC	0,2 x SSC
0,1% SDS	0,1% SDS	0,1% SDS
20 mM Phosphatpuffer	20 mM Phosphatpuffer	20 mM Phosphatpuffer

50 x Phosphatpuffer:

1 M NaH_2PO_4 x H_2O

1 M Na_2HPO_4 x H_2O

0,1 M Na_4PO_7 x 10 H_2O

Waschschritte:

5 x Lösung 1 je 10 Min. bei 68°C

4 x Lösung 2 je 15 Min. bei 68°C

1-2 x Lösung 3 je 30 Min. bei 68°C

Es ist wichtig, in möglichst großem Volumen zu waschen, und, wenn möglich, auch zu schütteln. Durch die absteigende SSC Konzentration kann die Stringenz ebenfalls beeinflußt werden. Sucht man Hybridisierung in kleinen Fragmenten, sollte die Waschkdauer in 0,2 x SSC reduziert werden, da sonst hybridisierte DNA wieder abgewaschen werden kann.

Nach dem Waschen werden die NC-Filter 30 Min. bei 80°C getrocknet und in eine Kassette mit zwei Verstärkerfolien gelegt. Die NC-Filter werden mit Klarsichtfolie abgedeckt, damit sie nicht am Röntgenfilm haften bleiben. Dann wird unter Rotlicht ein Kodak X-Omat AR Film aufgelegt und für 3-8d bei -70°C exponiert. Die Röntgenfilme werden in Röntgen entwickelt und in Superfix fixiert (s. Angaben des Herstellers).

Die Auswertung erfolgt über eine 1:1 Vergrößerung des Gelbilds.

Die NC-Filter wurden teilweise nach Abklingen der Radioaktivität zur Hybridisierung mit einer anderen radioaktiven Probe wieder verwendet.

D. Ergebnisse

1. Hybridisierung der Schenastämme mit dem Insertionselement ISR1

Das Insertionselement ISR1 (Insertionselement aus *Rhizobium lupini* Nr. 1) wurde von Pühler und Priefer (A.Pühler, 1976; U. Priefer, 1980; U. Priefer et al., 1980) in einem von Heumann isolierten *Rhizobium lupini* Stamm (Heumann, 1968), der jetzt der Klasse IV des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae zugeordnet wird, nachgewiesen. Pühler und Priefer beobachteten , daß das zur Inkompatibilitätsgruppe IncP1 gehörende Resistenzplasmid RP4 in *R. lupini* auffallend instabil ist. Außerdem stellten sie fest, daß der Transfer chromosomaler Gene bei RP4 tragenden *R. lupini* Zellen reprimiert wird (A. Pühler et al., 1974; A. Pühler und H. J. Burkardt, 1978).

Das RP4 Plasmid, das ursprünglich aus *Pseudomonas aeruginosa* stammt (B. W. Holloway und M. H. Richmond, 1973), verleiht seiner Wirtszelle Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin (Ap), Kanamycin (Km), Neomycin (Nm) und Tetracyclin (Tc). Das Ampicillinresistenzgen, das für die β -Lactamase Produktion codiert, liegt auf dem Transposon Tn1 (R. W. Hedges und A. E. Jacob, 1974; F. Heffron et al., 1975a,b; A. Campbell et al., 1977). Der Wirtsbereich von RP4 umfasst alle gram negativen Bakterien (N. Datta et al., 1971; N. Datta und R. W. Hedges, 1972). Im Gegensatz zu anderen *Rhizobium* Wildtyp Stämmen, wie *R. trifolii* (F. O'Gara und L. K. Dunican, 1973) und *R. leguminosarum* (J. Beringer, 1974) ist das RP4 Plasmid in Klasse IV Stämmen nicht stabil etablierbar (A. Pühler, 1976; U. Priefer, 1980). Die Verlustrate für

das gesamte Plasmid liegt bei 50-60%. RP4 Plasmide, die Mutationen in einem Resistenzgen aufweisen, können mit einer Rate von 10% isoliert werden, ebenso transferdefekte (Tra⁻) RP4 Plasmide. Aber auch die Antibiotika sensitiven und transferdefekten Mutanten sind nicht stabil, sondern werden nach einigen Generationen eliminiert.

Im Verlauf ihrer Dissertation konnte Priefer zeigen, daß die hohe Instabilität des RP4 Plasmids in Klasse IV Stämmen durch ein Insertionselement (ISR1) hervorgerufen wird. Es gelang ihr die RP4 Mutanten durch Rücktransfer nach E. coli zu stabilisieren und zu analysieren.

ISR1 ist nach Angaben von Priefer 1,15 kb lang und enthält je eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme HindIII, PstI und BamHI (s. Abb. 2).

ISR1 kann in beiden Orientierungen inserieren. Es gibt drei bevorzugte Insertionsorte auf dem RP4 Plasmid. Am häufigsten inseriert ISR1 in das sehr AT-reiche Ampicillinresistenztransposon Tn1. Durch ISR1 hervorgerufene Mutationen können auf zwei Arten entstehen: entweder durch Integration in dem betreffenden Gen, oder durch Insertion mit anschließender Deletion. Die Deletionen beginnen an den Enden von ISR1 und können in eine oder beide Richtungen verlaufen. So führt zum Beispiel die Insertion von ISR1 in das Transposon Tn1 nicht zu Resistenzverlust, sondern erst die nachfolgenden Deletionen. Weitere bevorzugte Insertionsorte von ISR1 auf dem RP4 Plasmid sind die Kanamycinresistenzregion und die Transfer-region 3.

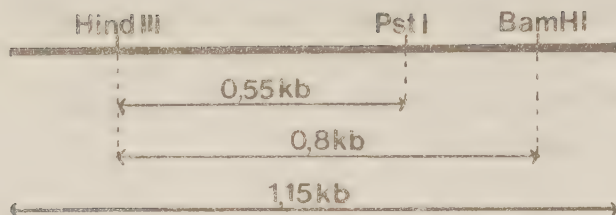


Abb. 2: Restriktionskarte von ISR1 (nach Priefer, 1980).

In den folgenden Versuchen sollte nun untersucht werden, ob ISR1 auch in den anderen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae vorkommt, und ob es möglicherweise eine Rolle bei der Genomumstrukturierung spielt. Die Vertreter dieser fünf Klassen werden im folgenden Text auch als Schemastämme bezeichnet.

1. Hybridisierung verschiedener Klasse IV Stämme mit ISR1 und Bestimmung der Kopienzahl

Die Voraussetzung, Aussagen über das Verhalten von ISR1 bei der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae treffen zu können, war die Bestimmung der Positionen und der Kopienzahl von ISR1 in den Stämmen der Klasse IV, seiner Herkunftsklasse. Hierfür wurde die Gesamt-DNA verschiedener Klasse IV Stämme unterschiedlicher Herkunft mit Restriktionsenzymen gespalten, die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und mit ^{32}P markiertem ISR1 hybridisiert. Als radioaktive Probe

diente das von Priefer zur Verfügung gestellte Plasmid ColE1::Tn1::ISR1, das in Abb. 3 gezeigt wird. Als negative Kontrolle wurde jeweils ein zweites, identisches Gel zur Hybridisierung mit ColE1::Tn1 angefertigt.

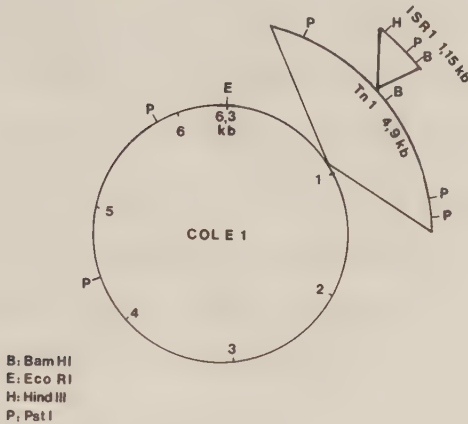


Abb. 3: Karte des ColE1::Tn1::ISR1 Plasmids

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Stämme.

Stamm	genet. Markierung	Herkunft
1-37	ilv, ctr	Umstrukturierung aus <i>R. lupini</i>
1-99	Biotin ⁻ , Sm-r	Umstrukturierung aus <i>R. lupini</i>
1-624	ilv, Fc ⁺ d ⁻ , Sm-r	Umstrukturierung aus <i>R. lupini</i>
1-927	AS aux, Fc ⁻ d ⁻	Umstrukturierung aus <i>R. japonicum</i> CB 1809
1-928	aux	Umstrukturierung aus <i>R. japonicum</i> 31 Ib1
1-929	ilv, aux, Fc ⁺ d ⁺	Umstrukturierung aus <i>R. meliloti</i> 20-43*
1-931	ilv, Fc ⁺ d ⁺	Umstrukturierung aus Minimaltyp 31-1*
1-932	ilv, Fc ⁺ d ⁺	Umstrukturierung aus <i>R. meliloti</i> 20-1
1-933	ilv, Fc ⁺ d ⁺	Umstrukturierung aus <i>A. tumefaciens</i> B6
1-936	aux	Umstrukturierung aus Nif-Typ 30-36*
1-937	prt	Umstrukturierung aus <i>R. trifolii</i> DSM 30141
33-35	prt, bact.	Umstrukturierung aus 4-22* (roter car Typ)

Tab. 1: Übersicht über die für die folgenden Experimente verwendeten Klasse IV Stämme.

Stämme, die mit 1- bezeichnet werden sind stäbchenförmig, die mit 33- bezeichneten Stämme wachsen als Bacteroide. Klasse IV Stämme besitzen keine Plasmide. Die mit * gekennzeichneten Herkunftsstämme sind ebenfalls durch Umstrukturierung aus einem anderen Stamm entstanden. *R. meliloti* 20-43 entstand durch Umstrukturierung aus Klasse IV Stamm 33-1, der wiederum nach Umstrukturierung von *R. meliloti* 20-1 isoliert wurde. Minimaltyp 31-1 wurde nach Umstrukturierung aus *R. meliloti* 20-43 erhalten. Nif-Typ 30-36 entstand durch Umstrukturierung von *R. trifolii* DSM 30141. Stamm 4-22 (roter car Typ Klasse V) entstand durch Umstrukturierung von 30-18 (Nif-Typ), der wiederum wurde durch Umstrukturierung von *R. meliloti* 20-1 erhalten.

1.1.1. Hybridisierung HindIII verdauter Gesamt-DNA

Zuerst wurde HindIII verdaute Gesamt-DNA der Stämme 1-99, 1-624 und 1-37 mit Cole1::Tn1::ISR1 und Cole1::Tn1 hybridisiert. Diese Stämme wurden ausgesucht, da sie alle durch Umstrukturierung aus demselben Ausgangsstamm, *R. lupini*, entstanden sind. Daher wurde ein einheitliches Hybridisierungsmuster erwartet. Die Gesamt-DNA wurde mit HindIII verdaut, da bekannt war, daß ISR1 eine Erkennungssequenz für HindIII hat. Dadurch sollte das Auftreten mehrmolarer Hybridisierungsbanden, bedingt durch das Vorhandensein mehrerer Kopien von ISR1 im gleichen Restriktionsfragment, vermieden werden. Zur Kopienzahlbestimmung muß also die Anzahl der hybridisierenden Banden halbiert werden. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt.

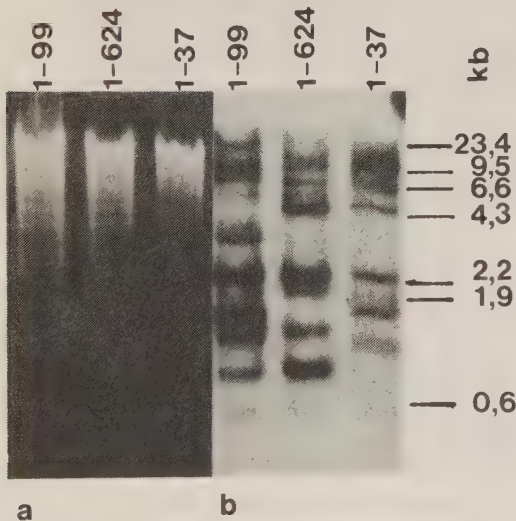


Abb. 4: Hybridisierung HindIII verdauter Gesamt-DNA der Stämme 1-99, 1-624 und 1-37 mit Cole1::Tn1::ISR1
Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 1,5h
Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°C
Längenstandard: Lambda mit HindIII verdaut

Die negative Kontrolle zeigte keine Hybridisierung und ist deshalb nicht dargestellt.

Alle drei Stämme zeigen ein etwas unterschiedliches Hybridisierungsmuster. Es existieren Banden, die alle drei Stämme gemeinsam haben, Banden, die nur jeweils bei zwei Stämmen gleich sind, und solche, die nur in einem Stamm vorkommen. Die Stämme haben die gleiche Herkunft, und soweit bei Auftrennung von Restriktionsfragmenten von Gesamt-DNA beurteilbar, das gleiche Restriktionsmuster. Das resultierende, unterschiedliche Hybridisierungsbild ist daher ungewöhnlich. Deshalb war es interessant, weitere Klasse IV Stämme mit ISR1 zu hybridisieren. In diese Versuche wurde auch ein Vertreter der bacteroid-bildenden Klasse IV Stämme, 33-35, mit einbezogen.

1.1.2. Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA

Jetzt wurde die Gesamt-DNA der zu untersuchenden Stämme mit XhoI verdaut. Das Restriktionsenzym XhoI wurde gewählt, da bisher keine Schnittstelle für XhoI in ISR1 bekannt war. Der Vergleich der Hybridisierungsmuster HindIII und XhoI gespaltenen Gesamt-DNA sollte dann Aufschluß über die Kopienzahl von ISR1 in den untersuchten Stämmen geben. Das Ergebnis ist in Abbildung 5a und 5b dargestellt. Auch hier ergab die negative Kontrolle keine Hybridisierung mit dem Trägerplasmid ColE1::Tn1 und wird deshalb nicht abgebildet.

Auch hier wird deutlich, daß die meisten Stämme bei gleichem Restriktionsmuster ein unterschiedliches Hybridisierungsmuster aufweisen. Eine Ausnahme bilden die Stämme 1-928 und 1-929. Diese beiden Stämme zeigen ein für sich identisches, aber von

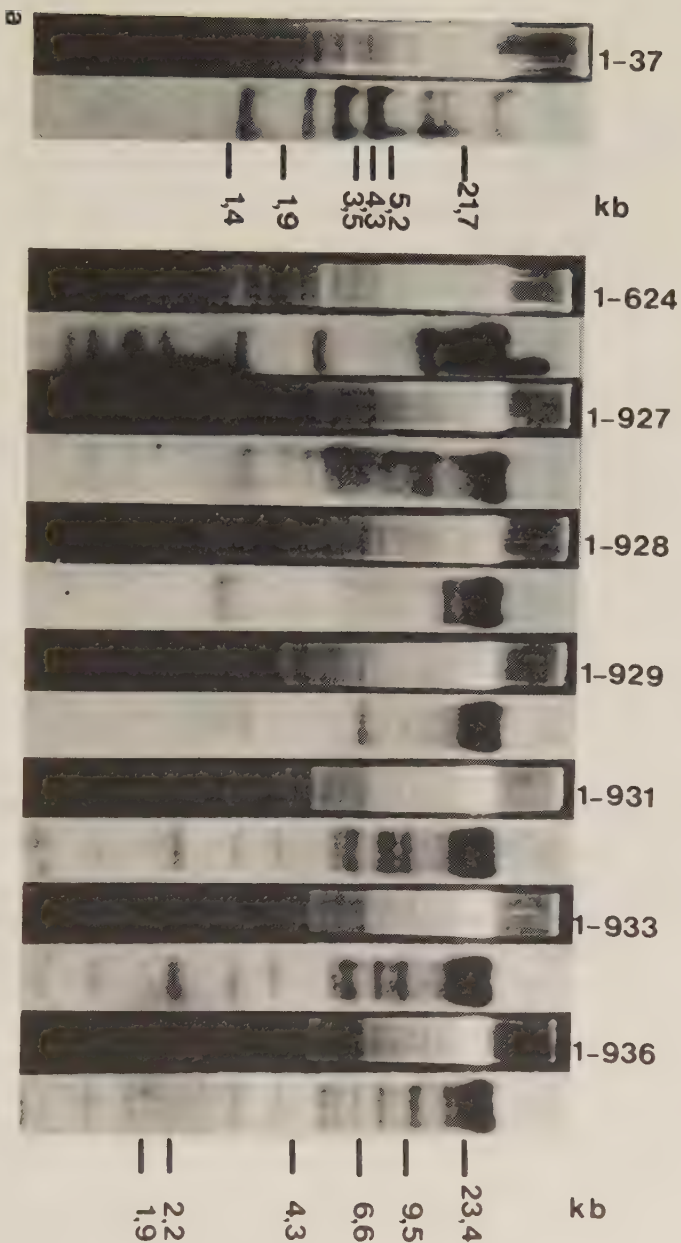


Abb. 5a: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA verschiedener Klasse IV Stämme.

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h:

Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°C.

Längenstandard: Lambda DNA, verdaut mit HindIII

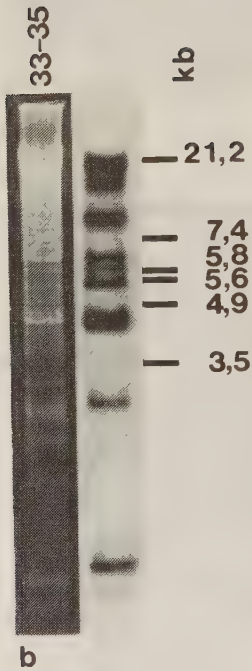


Abb. 5b: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA von 33-35 mit ColE1::Tn1::ISR1.
Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 15V, o.n.
Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°C
Längenstandard: Lambda DNA mit EcoRI gespalten.

allen anderen, bisher untersuchten Klasse IV Stämmen verschiedenes Restriktionsmuster. Sie weisen auch ein von den anderen Klasse IV Stämmen völlig verschiedenes Hybridisierungsmuster mit ISR1 auf. Interessant ist, daß auch die morphologisch differenzierten, bacteroid-bildenden Stämme ein mit den stäbchenförmigen Klasse IV Stämmen identisches Restriktionsmuster besitzen. Das gilt für alle bisher untersuchten 33-Stämme.

Beim Vergleich mit dem Hybridisierungsmuster der HindIII verdauten Gesamt-DNA fällt auf, daß etwa gleich viele Hybridisierungsbanden auftreten. Die Ursache für die Entstehung dieser Banden mußte eine bisher unbekannte Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI in ISR1 sein.

1.1.2.1. Nachweis einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI in ISR1

Zur Bestätigung dieser XhoI Schnittstelle wurde das Plasmid ColE1::Tn1::ISR1 mit XhoI und weiteren, geeigneten Restriktionsenzymen gespalten. Diese Spaltungen sind in Abb. 6 dargestellt. Die nach Auswertung dieser Spaltungen erhaltene Lokalisation der XhoI Schnittstelle in ISR1 ist in Abbildung 7 gezeigt.

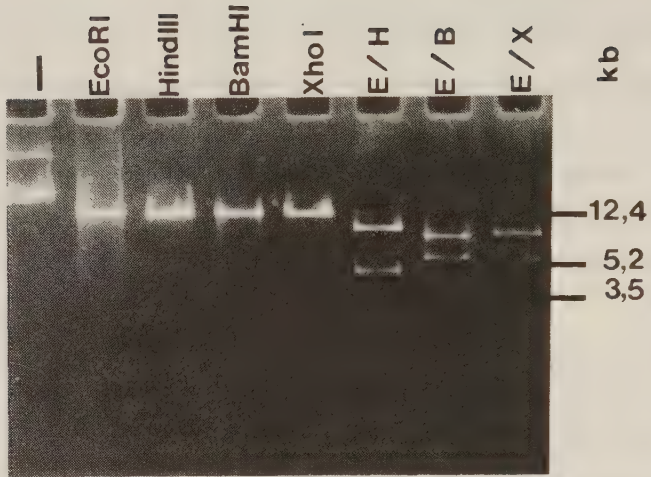


Abb. 6: Restriktionsanalyse von ColeI::Tn1::ISR1 zur Bestätigung der XhoI Schnittstelle.
Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, ~2h

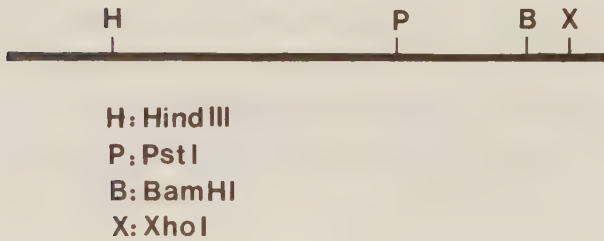


Abb. 7: Lokalisation der XhoI Schnittstelle von ISR1

Alle weiteren Untersuchungen am Schema der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae sollten an einer repräsentativen Auswahl an Stämmen aller Klassen vorgenommen werden, um eine größtmögliche Übersicht der Ergebnisse zu erreichen. Hierfür wurden Vertreter aller Klassen zusammengestellt, die möglichst direkt (d. h. ohne Umwege über eine andere Klasse) aus demselben Ausgangsstamm durch Umstrukturierung erhalten worden waren. Es wurde je ein solcher Vertreter jeder Klasse, der durch Umstrukturierung aus *R. meliloti* 20-1 (*R. meliloti* Schema) bzw. aus *R. trifolii* DSM 30141 = 8-34 (*R. trifolii* Schema) entstanden war, ausgewählt (s. C.2.1., S. 15). Das *R. meliloti* - und das *R. trifolii* Schema unterscheiden sich in zwei Punkten. Es ist bisher nicht gelungen, aus *R. meliloti* Stämmen Prowildtyp (Klasse II) durch Umstrukturierung zu erhalten. Analog wurde aus *R. trifolii* bisher kein gelber, bacteroid-bildender Stamm ohne Umwege über andere Klassen gewonnen. Auch der hier verwendete Stamm 33-5 wurde über einen Umweg aus einem Umstrukturierungsversuch des Nif-Typ Stammes 30-18, dessen Ursprung *R. meliloti* 20-1 ist, erhalten.

1.1.3. Bestimmung der Kopienzahl von ISR1 in den Stämmen

1-932 und 33-5

Diese Versuche wurden nur mit den Stämmen 1-932 und 33-5 durchgeführt. Diese Stämme sind durch Umstrukturierung aus *R. meliloti* 20-1 entstanden. Es mußte nun ein Restriktionsenzym gefunden werden, das keine Schnittstelle in ISR1 besitzt, und ein gut auflösbares Restriktionsmuster der Gesamt-DNA im Agarosegel ergibt.

Vorversuche zeigten, das SmaI-ein geeignetes Enzym für die Verifizierung der Kopienzahl von ISR1 in Klasse IV Stämmen darstellt. Es besitzt keine Schnittstelle in ISR1. SmaI verdaute Gesamt-DNA von Klasse IV Stämmen ergibt ein im Agarosegel gut auflösbares Restriktionsmuster.

Abbildung 8 zeigt die Hybridisierung SmaI verdauter Gesamt-DNA von 1-932 und 33-5 mit Cole1::Tn1::ISR1.

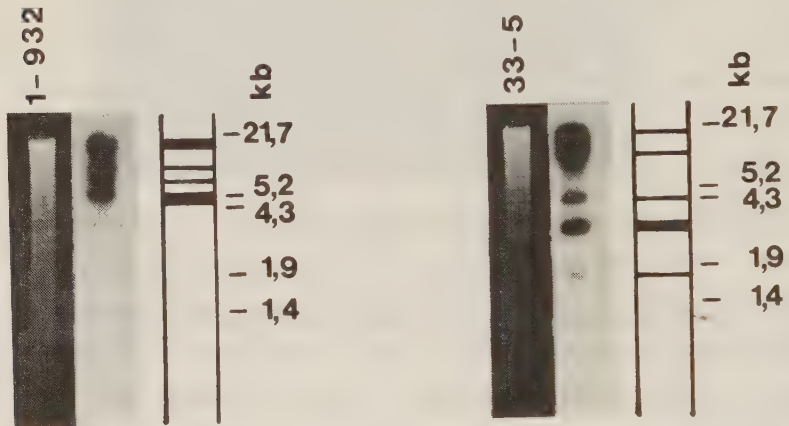


Abb. 8: Hybridisierung SmaI verdauter Gesamt-DNA von 1-932 und 33-5

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 50V, 2h

Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°C

Längenstandard: Lambda DNA, gespalten mit EcoRI und

HindIII

Somit liegt ISR1 in 1-932 und 33-5 in mindestens 6 Kopien vor.

1.1.4. Hybridisierung der Klasse IV spezifischen Phagen
mit ISR1

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die DNA der Klasse IV spezifischen Phagen, 1 und 33, ISR1 enthält. Die Phagen-DNA wurde von E. Traeg zur Verfügung gestellt. HindIII/BamHI doppelt verdauete Phagen-DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und mit ^{32}P markierter ColE1::Tn1::ISR1 DNA hybridisiert. Ein zweites, identisches Gel diente wieder als negative Kontrolle zur Hybridisierung mit ColE1::Tn1. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

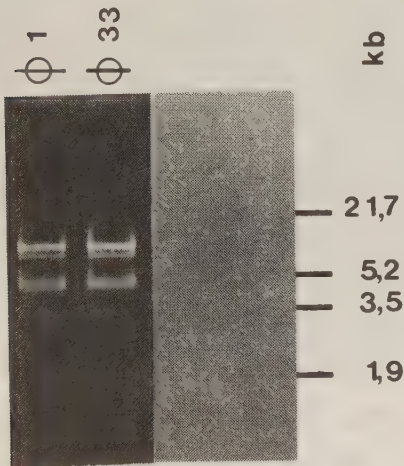


Abb. 9: Hybridisierung der Klasse IV spezifischen Phagen
Phi 1 und Phi 33 mit ColE1::Tn1::ISR1
Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h
Hybridisierungsbedingungen: 5 x SSC, 50% Formamid, 43°C
Längenstandard: Lambda DNA, gespalten mit EcoRI und
HindIII

Wie Abbildung 9 zu entnehmen ist, besteht keine Homologie der Klasse IV spezifischen Phagen, Phi 1 und Phi 33, zu ISR1.

1.2. Hybridisierung repräsentativer Stämme aller Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae mit dem Insertionselement ISR1

1.2.1. Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

In den nun folgenden Versuchen sollte die Kopienzahl des Insertionselements ISR1 in den übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae untersucht werden. Die Gesamt DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas und des *R. trifolii* Schemas (Auswahl der Stämme s. S. 61) wurde mit *Xho*I verdaut, im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und mit ³²P markierter ColE1::Tn1::ISR1 DNA hybridisiert. Von jedem Gel wurde ein zweites, identisches Gel für die negative Kontrollhybridisierung angefertigt. Außerdem wurde das Hybridisierungsbild von Gesamt-DNA aus *Klebsiella pneumoniae*, *Xanthomonas holcicola*, *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli* untersucht. Die Hybridisierung der Gesamt-DNA dieser Stämme mit ISR1 sollte Aufschluß über die generelle Verbreitung von ISR1 in anderen Bakterien geben. Die DNA wurde mit *Xho*I gespalten, um das Auftreten mehrmolarer Hybridisierungsbanden zu vermeiden. Die Hybridisierungen wurden unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Für die Berechnung der Stringenz wurde , wie für die vorhergehenden Versuche der mittlere GC-Gehalt der Klasse IV Stämme von 65,3% zu Grunde gelegt. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 und 11 dargestellt. Die negativen Kontrollen

zeigten keine Hybridisierung und sind deshalb nicht abgebildet. ISR1 zeigt keine Homologie zu Gesamt-DNA der Stämme *K. pneumoniae*, *X. holcicola*, *X. badrii*, *P. aeruginosa* und *E. coli* (Daten nicht gezeigt).

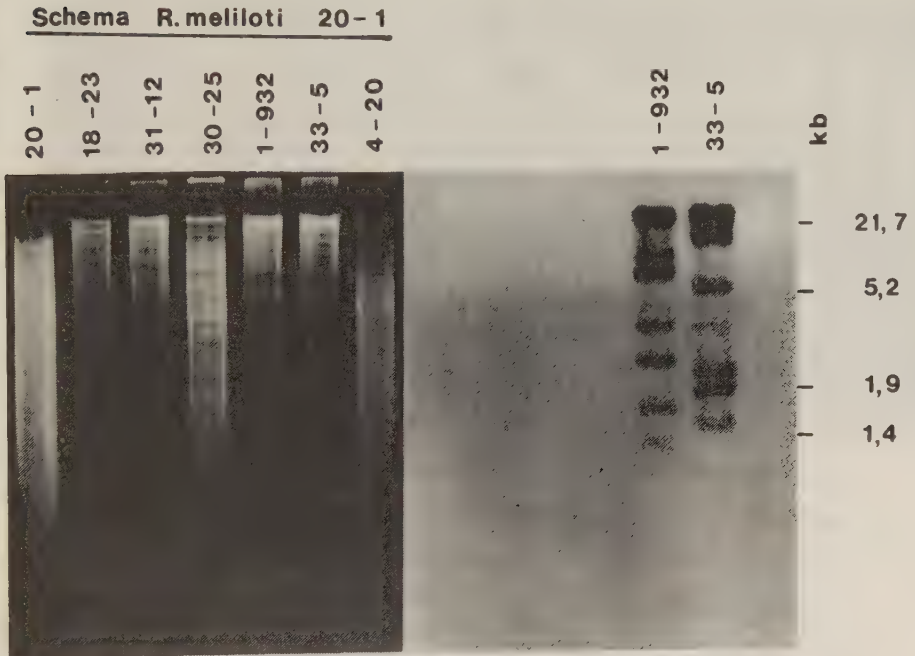


Abb. 10: Hybridisierung *Xho*I verdauter Gesamt-DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas mit *ColE1::Tn1::ISR1*
 Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h
 Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°C
 Längenstandard: Lambda DNA, gespalten mit *Eco*RI und *Hind*III.

Schema R.trifolii 8-34

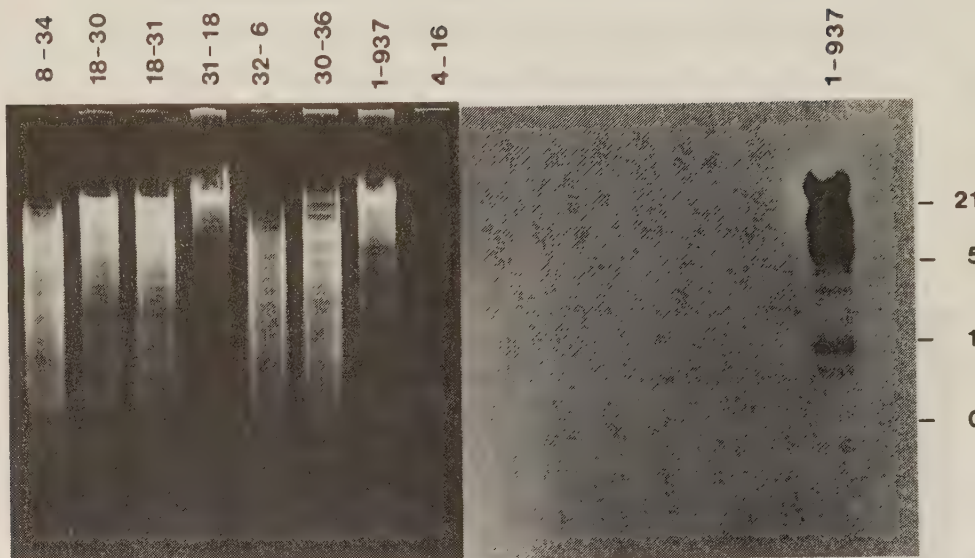


Abb. 11: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA der Stämme des *R. trifolii* Schemas mit ColE1::Tn1::ISR1

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h

Hybridisierungsbedingungen: 3 x SSC, 50% Formamid, 46°

Längenstandard: Lambda DNA, gespalten mit EcoRI und HindIII.

Beide Hybridisierungen zeigen keinerlei Homologie zwischen ISR1 und Gesamt-DNA der Stämme der übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae. Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses wurde in mehreren Wiederholungsversuchen bestätigt.

Auch in dieser Hybridisierung mit XhoI gespaltenen Gesamt-DNA zeigen die Stämme 1-932 und 33-5 bei gleichem Restriktions-

muster ein unterschiedliches Hybridisierungsbild.

1.2.2. Hybridisierung unter relaxierenden Bedingungen

Ausgehend von der Annahme, daß bei der Umstrukturierung auch Veränderungen in der DNA Sequenz von ISR1 erfolgen könnten, wurden die Hybridisierungen noch einmal unter relaxierenden Bedingungen wiederholt. Die Gesamt-DNA derselben Stämme wie im vorhergehenden Versuch wurde mit XhoI gespalten, im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und mit ³²P-markierter ColE1::Tn1::ISR1 DNA hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden in 5 x SSC, 50% Formamid und 10% Dextranulfat bei folgenden Temperaturen durchgeführt: 37°C, 39°C, 41°C und 43°C. Gewaschen wurde bis 1 x SSC und bei 55°C. Trotz dieser relaxierenden Hybridisierungsbedingungen konnte in keinem Fall in den übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae Homologie zu ISR1 nachgewiesen werden. Auch unter relaxierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, daß in den Stämmen *X. holcicola*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. coli* keine zu ISR1 verwandte Sequenz vorkommt. ISR1 besitzt ebenfalls keine Homologien zu *X. badrii* und *Bacillus subtilis* (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 12 ist stellvertretend für diese Versuchsreihe nur das Ergebnis der Hybridisierung unter den relaxierensten Bedingungen, die angewendet wurden, gezeigt (37°C). In diesem Fall wird auch das Ergebnis der negativen Kontrolle abgebildet. Die Hybridisierung mit Gesamt-DNA aus *E. coli* ist auf Homologien des Trägerplasmids ColE1::Tn1 mit *E. coli* DNA zurückzuführen.

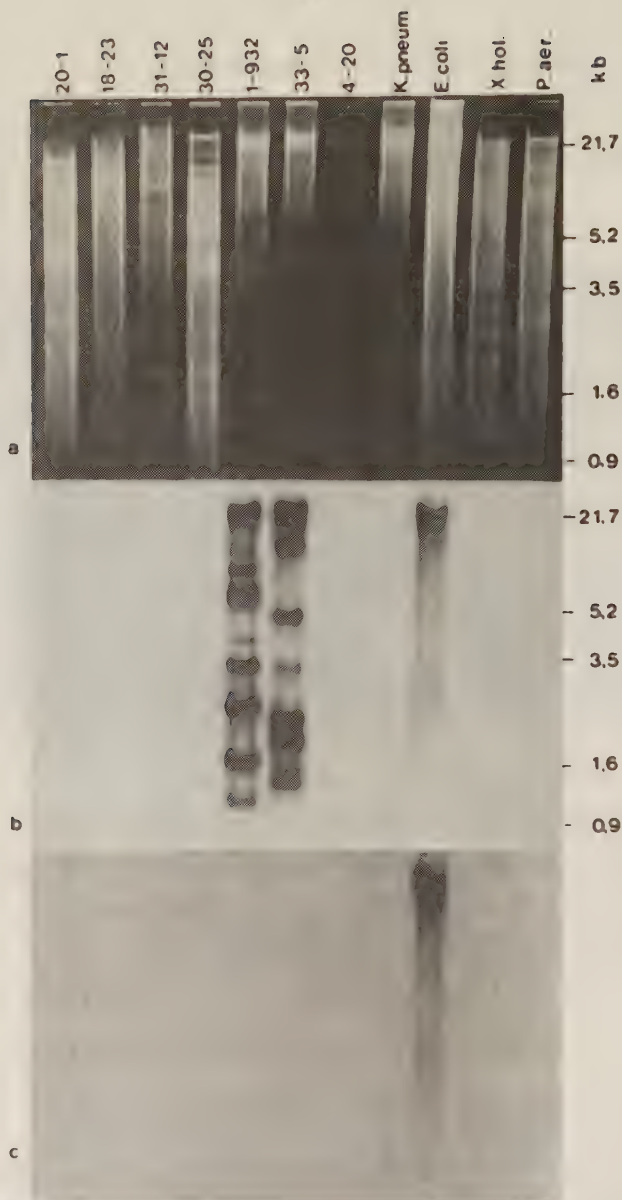


Abb. 12: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas und *K. pneumoniae*, *E. coli* *X. holcicola* (EcoRI verdaut !) und *P. aeruginosa* mit *ColE1*::*Tn*::*l8R1*.

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h.
Hybridisierungsbedingungen: 5 x SSC, 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 37°C

zu Abb. 12: Längenstandard: Lambda DNA, verdaut mit EcoRI und HindIII.

- a) Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente
- b) Hybridisierung mit ColE1::Tn1::ISR1
- c) Hybridisierung mit ColE1::Tn1 (negative Kontrolle)

1.3. Hybridisierung von Gesamt-DNA weiterer Rhizobium-Wirtstypen mit ISR1

Zum Nachweis, daß ISR1 nur in den Klasse IV Stämmen vorkommt, wurde noch Gesamt-DNA weiterer, bisher nicht untersuchter, Rhizobienstämmen mit ColE1::Tn1::ISR1 hybridisiert. In diesen Versuchen wurde darauf geachtet, ein möglichst breites Spektrum an Rhizobium Wirtstypen einzusetzen. Da in Erlangen außerdem eine gute Auswahl an *R. meliloti* Stämmen zur Verfügung steht (Horn, 1981), wurden diese Stämme mit einbezogen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Stämme.

Stamm	Wirtspflanze	Herkunft
<i>R. meliloti</i> MVII/I	Luzerne	Kamberger, Erl.
<i>R. trifolii</i>	Klee	DSM Göttingen
<i>R. japonicum</i>	Sojabohne	"
<i>R. phaseoli</i>	Bohne	"
<i>R. leguminosarum</i>	Erbse	Beringer, Norwich
<i>R. meliloti</i> E1-E10	Luzerne	Horn, Erl.
<i>R. lupini</i>	Lupine	DSM Göttingen
4-42 (= CB376)	<i>Lotononis bainesii</i>	Broughton, Köln

Tabelle 2: Übersicht über die, im folgenden Versuch verwendeten, Rhizobium-Wirtstypen

Die Gesamt-DNA wurde für die Hybridisierung mit EcoRI verdaut. EcoRI spaltet Gesamt-DNA der Klasse IV Stämme nicht, ist aber sehr gut zur Verdauung der Gesamt-DNA der übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae geeignet. Für diese Hybridisierung schien es sinnvoll, die Gesamt-DNA dieser Stämme mit einem Restriktionsenzym zu spalten, das keine Erkennungssequenz in ISR1 besitzt. Es sollte vermieden werden, daß eventuell vorhandene, schwach homologe Sequenzen durch eine Schnittstelle so zerteilt werden, daß sie für eine Hybridisierung nicht mehr ausreichen. Das Ergebnis wird in Abbildung 13 dargestellt.

ISR1 konnte somit in keinem, der bisher untersuchten Rhizobienstämme außerhalb der Klasse IV gefunden werden. Das Insertionselement ISRI stellt daher ein für die Klasse IV spezifisches IS-Element dar.

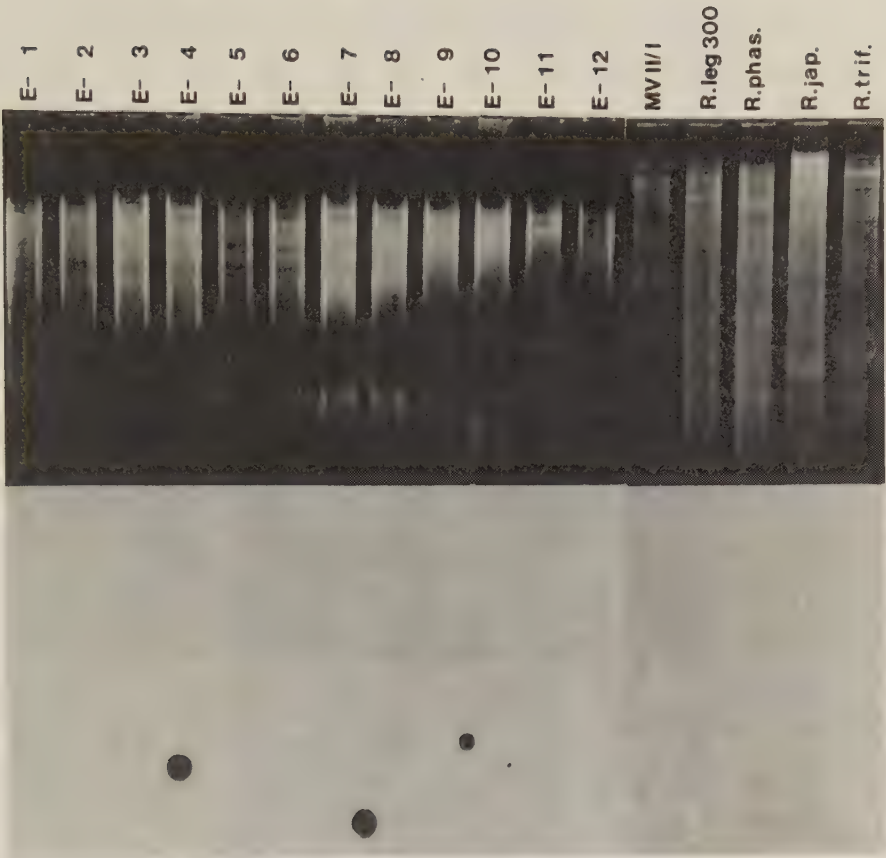


Abb. 13: Hybridisierung EcoRI verdauter Gesamt-DNA verschiedener Rhizobium-Wirtstypen mit Cole1::Tn1::ISR1.

Die Hybridisierungen wurden unter relaxierenden Bedingungen durchgeführt. In den entsprechenden negativen Kontrollen fand keine Hybridisierung statt.

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h.

Hybridisierungsbedingungen: 5 x SSC, 50% Formamid, 39°C.

1.4. Bestimmung der Stabilität des Insertionsortes von ISR1 in 1-932

Es war nun interessant, festzustellen, ob ISR1 unter Stressbedingungen seine Position im Genom von 1-Stämmen verändert. Für diese Untersuchung wurde wieder der aus *R. meliloti* 20-1 stammende Klasse IV Stamm 1-932 eingesetzt. 1-932 wurde über Nacht auf NB Platte angezogen, und davon dick in mehrere Röhrchen MM+Dextrin statt Glucose angeimpft. Diese Röhrchen wurden 6 Wochen bei 30°C gerollert. Danach wurden Einzelkolonien reisoliert und aus einer repräsentativen Anzahl Gesamt-DNA isoliert. XhoI verdaute Gesamt-DNA von 9 dieser Stämme und dem nicht gestressten Ausgangsstamm 1-932 wurde wieder mit ColE1::Tn1::ISR1 hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt.

Das Hybridisierungsmuster der gestressten Stämme zeigt nur geringfügige Unterschiede gegenüber dem Ausgangsstamm. Es war in allen Wiederholungsversuchen reproduzierbar. Die beobachteten, geringfügigen Veränderungen sind also nicht zufällig.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann die Rolle von ISR1 bei der Genom-umstrukturierung nicht geklärt werden. Es entsteht bei der Umstrukturierung von Wildtyp Stämmen und anderen Stämmen zur Klasse IV. Bei der erneuten Umstrukturierung von Klasse IV Stämmen in andere Klassen, verschwindet es wieder. Es ist also möglich, daß ISR1 für die Entstehung von Klasse IV Stämmen und ihre Umstrukturierung nötig ist.

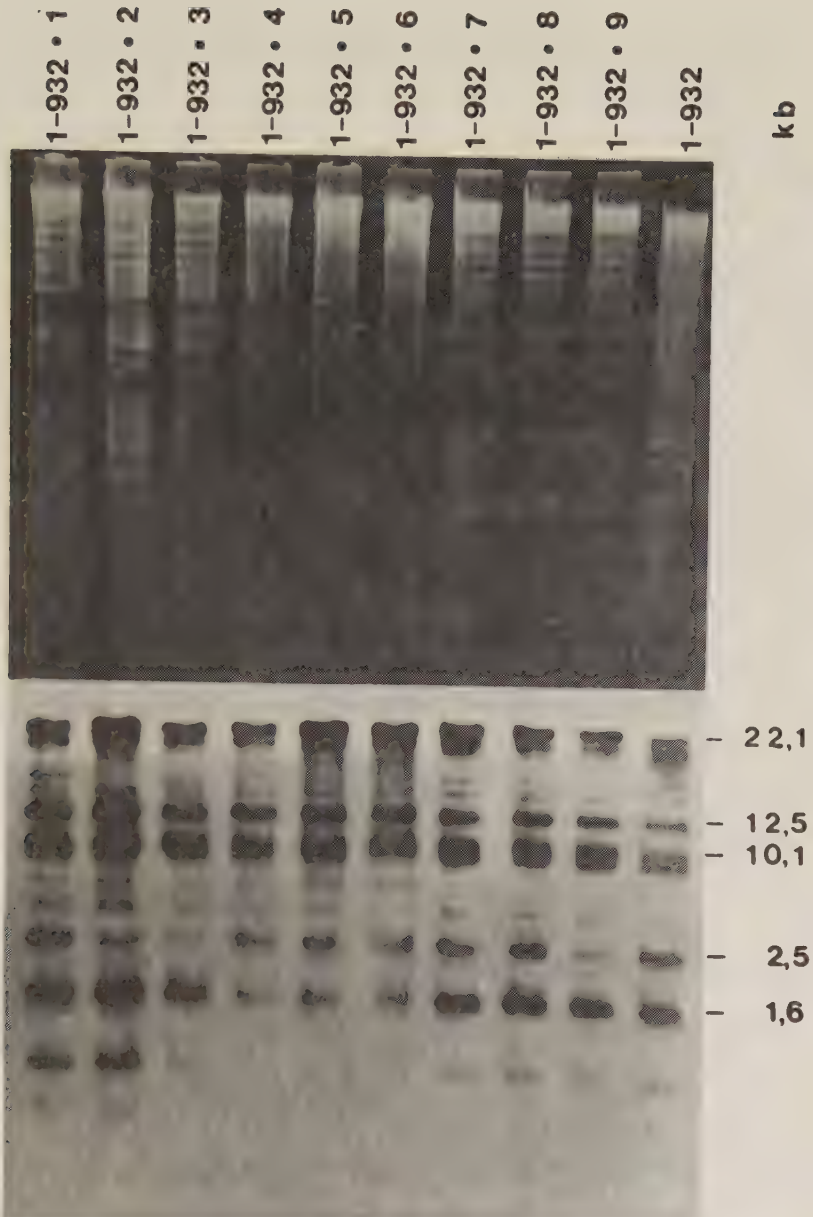


Abb. 14: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA der nach Stress reisolierten Einzelkolonien von 1-932

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 15V, o. n.

Hybridisierungsbedingungen: 5 x SSC, 50% Formamid, 46°C

2. Hybridisierung der Schemastämme mit dem Insertions- element ISRm1

Das Insertionselement ISRm1 (Ruvkun et al., 1982) ist spezifisch für den *R. meliloti* Stamm 1021. Es kommt, soweit bisher untersucht weder in anderen *R. meliloti* Stämmen noch in anderen Wirtsklassen von *Rhizobium* vor. Es besitzt eine sehr hohe Transpositionsfrequenz ($10^{-2} - 10^{-3}$) und translociert bevorzugt in 3 EcoRI Fragmente aus dem für die symbiontische Stickstofffixierung verantwortlichen Gencluster (*nif*-Region). Die Insertion führt zu einem *Fix*⁻ Phänotyp. ISRm1 ist 1,4 kb lang und kommt in 10 Kopien im *R. meliloti* 1021 Genom vor.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Schemastämme zu ISRm1 homologe Sequenzen besitzen. Das IS-Element ISRm1 wurde von Ausubel auf dem Plasmid pRmR3::ISRm1 zur Verfügung gestellt. pRmR3 setzt sich zusammen aus dem Vektorplasmid pACYC184 und einem 5kb EcoRI Fragment aus der *R. meliloti* *nif*-Region mit inseriertem ISRm1 (Ausubel, 1982). Dieses EcoRI Fragment liegt in der *nif*-Region rechts neben den Nitrogenase-Strukturgenen D und H (s. Abb. 15)

Für die Hybridisierung wurde wieder XhoI verdautе Gesamt-DNA der *R. meliloti* 20-1 Schema Stämme eingesetzt. Das Restriktionsenzym XhoI wurde verwendet, da ISRm1 keine Erkennungssequenz für dieses Enzym besitzt (Ruvkun et al., 1982). Für die Berechnung der optimalen Hybridisierungstemperatur wurde der mittlere GC Gehalt der *R. meliloti* Stämme von 62,6°C zu Grunde gelegt. Als negative Kontrolle diente ein identisches Gel, das mit

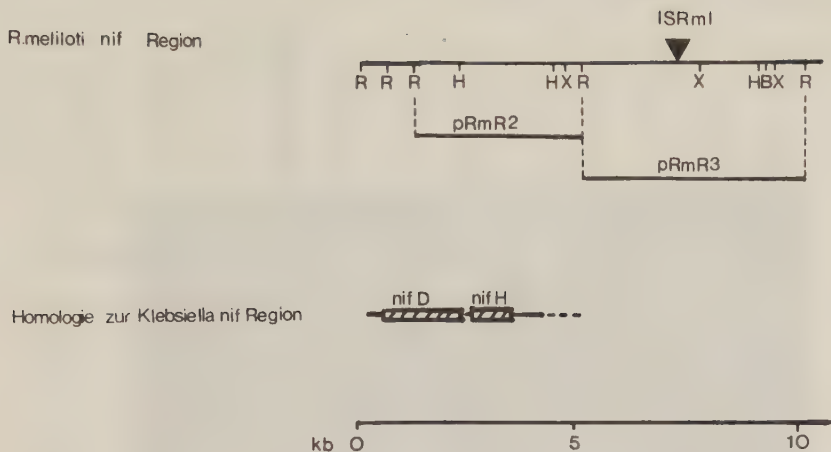


Abb. 15: Lokalisation des in pRmR3 klonierten EcoRI Fragments in der *R. meliloti* nif-Region.

Dieses EcoRI Fragment liegt rechts neben den Genen, die Homologie zu den Nitrogenase Strukturgenen aus *K. pneumoniae* zeigen. Das schwarze Dreieck gibt den Insertionsort von ISRM1 an.

pACYC184 hybridisiert wurde. Als weitere Kontrollen dienten *XhoI* verdaute Gesamt-DNA von *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *EcoRI* verdaute Gesamt-DNA aus *X. holcicola*. Da in den negativen Kontrollen, außer mit 30-25 keine Hybridisierung stattfand, werden diese nicht gezeigt. Die Hybridisierung von pACYC184 mit Gesamt-DNA aus 30-25 beruht auf einer Homologie zur Sequenz des Tetracyclin-resistenzgens, wie von Horn gezeigt werden konnte (Horn,

1982). Das Ergebnis der Hybridisierung mit pRmR3 ist in Abbildung 16 dargestellt.

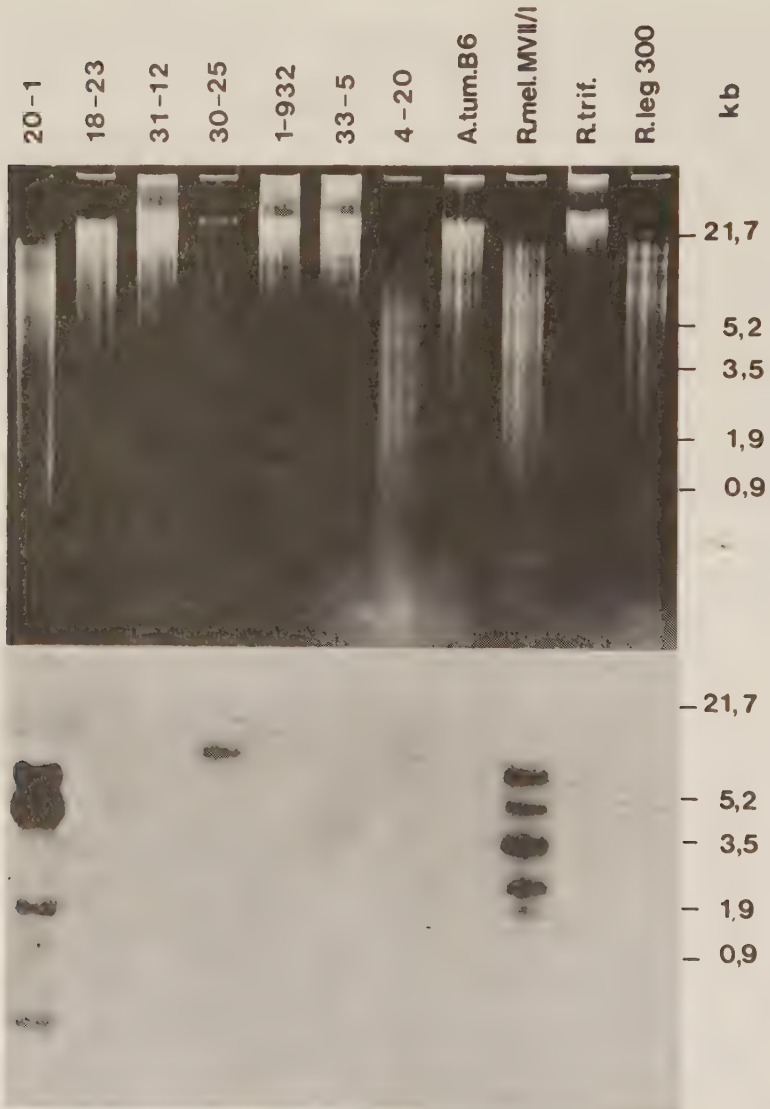


Abb. 16: Hybridisierung XhoI verdauter Gesamt-DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas und verschiedener Rhizobium-Wirtstypen mit pRmR3.

zu Abb. 16: Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 80V, 2h
Hybridisierungsbedingungen: 5 x SSC, 50% Formamid,
43°C
Längenstandard: Lambda DNA, gespalten mit EcoRI
und HindIII

Es ist keine Hybridisierung mit den Stämmen des *R. meliloti* Schemas und verschiedenen Rhizobium-Wirtstypen mit dem Insertionselement ISRM1 nachweisbar. Die Hybridisierungsbanden mit 20-1 und MVII/1 sind auf Hybridisierung mit den *R. meliloti* nif-Genen, die in pRM3 kloniert sind, zurückzuführen. Die Hybridisierungsbande mit Gesamt-DNA von 30-25 ist bedingt durch die Homologie zur Tetracyclinresistenz des Vektors pACYC 184.

3. Suche nach weiteren IS-Elementen in den Schemastämmen und in verschiedenen Wildtypstämmen

Da die Insertionselemente ISR1 und ISRM1 nicht in allen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae nachweisbar waren, wurde angenommen, daß sie bei der Genomumstrukturierung keine wesentliche Rolle spielen.

Es wurde daher versucht, in den Schemastämmen weitere IS-Elemente zu identifizieren, und zu prüfen, ob diese Elemente an der Umstrukturierung beteiligt sind. In Vorversuchen hatten Homoduplexanalysen von Gesamt-DNA in allen Klassen Rückfaltungsstrukturen gezeigt, die auf IS-Elemente hinweisen.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Stämme ausgewählt:

- a) die Stämme des *R. meliloti* Schemas (ohne Klasse IV)
- b) die Stämme des *R. trifolii* Schemas (ohne Klasse IV)
- c) *R. meliloti* E9 und E10

R. meliloti 2011

R. meliloti MVII/1

R. leg. 300

R. phaseoli DSM 30137

R. japonicum CB1809

R. trifolii DSM 30141

A. tumefaciens B6

Die Herkunft dieser Stämme ist in C. 2.1. (S. 14 und 15) beschrieben.

Zur Isolierung von IS-Elementen wurde folgendes Versuchsprinzip verwendet:

In die zu untersuchenden Stämme wird das Resistenzplasmid RP4 transferiert, das seiner Wirtszelle Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin verleiht (N. Datta, et al., 1972). Nach der Konjugation wird das Resistenzmuster der Transkonjuganten überprüft.

Von Kolonien, die eine oder mehrere Resistenzen nicht mehr exprimieren, wird eine Plasmidanalyse durchgeführt (U. Priefer, 1980).

Das RP4 Plasmid ist für solche Versuche sehr gut geeignet. Durch seinen breiten Wirtsbereich ist es in alle gramnegativen Bakterien transferierbar (N. Datta, et al., 1972). Die drei Antibiotikaresistenzen bieten große, relativ leicht selektionsfähige Genregionen für mögliche Insertionen. Es wurde davon ausgegangen, daß das Ampicillinresistenzgen ein bevorzugter Insertionsort sein wird, da es sehr AT-reich ist. IS-Elemente inserieren bevorzugt in AT-reiche Regionen (J. Meyer, et al., 1980). Dieses Verhalten zeigt auch das IS-Element ISR1.

3.1. Bestimmung der Resistenz der zu untersuchenden Stämme für Ampicillin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin

Vor dem RP4 Transfer wurden die ausgewählten Stämme auf Resistenz gegenüber Ampicillin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin überprüft. Es war für die Auswertung der Kreuzungsversuche unbedingt erforderlich, zu wissen, ob diese Stämme bereits von Natur aus gegen eines der oben genannten Antibiotika resistent sind.

Alle Stämme wurden hierfür auf den entsprechenden Antibiotikaplatten in Standardkonzentrationen ausgestrichen. Stämme, die auf diesen Platten wuchsen, wurden als resistent bezeichnet. Waren nur wenige Einzelkolonien gewachsen, wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe die Spontanresistenzrate bestimmt. Stämme, die nicht auf diesen Platten wuchsen, wurden als sensitiv angesehen. Auf die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurde verzichtet, da alle Versuche mit den Standard-Antibiotikaplatten durchgeführt werden sollten. Das Ergebnis der Resistenzbestimmung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Die chromosomal bedingte Kanamycin Resistenz der Rhizobiumstämme vermittelt im Gegensatz zu RP4 nicht gleichzeitig auch Neomycin Resistenz. Man kann diese Kanamycin Resistenz daher durch Selektion auf Neomycin umgehen!

Stamm		Ampicillin	Kanamycin	Neomycin	Tetracyclin
A. tumefaciens	18-23/30/31	-	+	-	-
Minimaltyp	31-12/18	+	+	-	-
R. meliloti	20-1	-	+	-	-
R. trifolii	8-34	-	4×10^{-6}	-	-
Nif-Typ	30-25/36	-	+	-	+
Roter Car Typ	4-20	+	-	-	-
R. meliloti	E9	-	+	-	-
R. meliloti	E10	-	+	-	-
R. meliloti	MVII/1	-	+	-	-
R. meliloti	2011	-	+	-	-
R. leguminos.	300	-	$6,4 \times 10^{-6}$	-	-
R. phaseoli	DSM 30 137	-	+	-	-
R. japonicum	CB 1809	-	$1,1 \times 10^{-5}$	+	+
A. tumefaciens	B6	-	-	-	-
E. coli	CSH56 Nx	-	-	-	-

Tab. 3: Ergebnis der Resistenzbestimmung der untersuchten Stämme

+ = resistent; - = sensitiv; die Zahlenwerte geben die Spontanresistenzrate an.

3.2. Gewinnung von streptomycinresistenten Stämmen

Für die Kreuzungen war eine Markierung des Rezipienten zur Gegenselektion des Donors erforderlich. Da alle Rhizobienstämme relativ leicht eine Spontanresistenz gegen Streptomycin entwickeln, wurden von den zu untersuchenden Stämmen streptomycinresistente Derivate isoliert. Eine Ausnahme bildete der Stamm 4-20. Bei diesem Stamm konnten keine streptomycinresistenten Kolonien gewonnen werden. RP4 tragende Transkonjuganten dieses Stammes wurden auf Grund des RP4 spezifischen Resistenzmusters und der roten Farbe identifiziert.

Zur Einführung der Streptomycinresistenz wurden von den Stämmen dicke Ausstriche auf Standard-Streptomycinplatten angefertigt und 1-2 Tage bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden nachgereinigt und auf signifikante Marker des Ausgangsstammes, wie Antibiotikaresistenzen und Plasmidmuster überprüft. Die erhaltenen streptomycinresistenten Stämme wurden für die folgenden Kreuzungen eingesetzt.

3.3. RP4 Transfer in die zu untersuchenden Stämme und Resistenzanalyse der Transkonjuganten

Das Resistenzplasmid RP4, das als Akzeptormolekül für IS-Elemente dienen sollte, wurde durch Filterkreuzung in die streptomycinresistenten Stämme transferiert. (Donor: E. coli SH300(RP4); Selektion NB oder YMB + Sm + Ap, Nm oder Tc, je nach Ausgangsresistenzmuster der Rezipienten. Die Transkonjuganten wurden auf NB bzw. YMB + Sm übertragen und durch Überstempeln auf Verlust von Resistenzmarkern

überprüft. Im Gegensatz zu den von U. Priefer (U. Priefer, 1980) untersuchten Klasse IV Stämmen konnten auf diese Weise keine Ap, Km, Nm oder Tc sensitiven Kolonien isoliert werden.

Bei Klasse I und Klasse II Stämmen wurde häufig eine Ampicillin-Sensitivität beobachtet, die vermutlich auf Störungen in der Expression des β -Lactamase Gens zurückzuführen ist. Wurden RP4 Plasmide aus solchen Kolonien nach E.coli zurückgekreuzt, konnte in allen Fällen die Ampicillin-resistenz wieder nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden von J. Ram und S. Kumar (J. Ram und S. Kumar, 1979) für RP1 in R. leguminosarum beschrieben. RP1 ist identisch mit RP4 (Burkardt et al., 1979).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die RP4 tragenden Rhizobienstämme über Nacht ohne Selektionsdruck in NB bzw. YMB bei 30°C gerollert und auf antibiotikafreien Platten ausgespatelt. Wieder wurden je 200 Kolonien auf die entsprechenden Resistenzen überprüft. Auch in diesem Versuch wurden außer den bereits erwähnten β -Lactamase expressionsdefekten Kolonien keine mit echtem Verlust der Ap, Km, Nm- oder Tc-Resistenz erhalten.

In diese Versuche wurden keine Klasse IV Stämme mit einbezogen, da diese bereits von U. Priefer untersucht worden waren. Es gelang nicht, von dem Stamm 4-16, RP4 tragende Transkonjuganten zu isolieren. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich eine Inkompatibilität des RP4 Plasmids zu einem der natürlich in 4-16 vorkommenden Plasmide. Prinzipiell ist der RP4 Transfer in Klasse V Stämme möglich, da es ohne Schwierigkeiten gelang, RP4 tragende Transkonjuganten von dem

plasmidfreien Stamm 4-20 zu isolieren.

3.4. Erzeugung von RP4 Mutanten durch Stress

3.4.1. Entwicklung geeigneter Stressbedingungen

Da mit den bisher angewendeten Methoden keine Insertionsmutanten isoliert werden konnten, wurde nun versucht, ob milde Stressbedingungen die Translocation anregen können.

Die von Heumann (W. Heumann et al., 1983) angewendeten Stressbedingungen:

- Ernte der Zellen von 10-20 Platten
- waschen in H_2O dest. und Aushungern in H_2O dest. über Nacht bei $30^{\circ}C$
- animpfen in verschiedenen Stressmedien und mehrwöchiges Rollern

führen nach 6-12 Wochen zu einer völligen Umorganisation des Rhizobiengenoms.

Es wurde angenommen, daß diese Bedingungen für die Isolierung von IS-Elementen zu massiv sind, da sie die vollständige Genomumstrukturierung zur Folge haben. Es sollte nun versucht werden, die Translocation von IS-Elementen durch abgemilderte Stressbedingungen anzuregen. Dabei sollten dann aus RP4 tragenden Rhizobien auch RP4 Moleküle mit rhizobien-spezifischen Insertionselementen isoliert werden können.

Die hierfür geeigneten Stressbedingungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Diese Vorversuche zeigten außerdem, daß der Hauptstressfaktor eine längere Inkubationsperiode ohne frische Nährstoffzufuhr ist, und das Wachstumsmedium nur eine geringe Rolle spielt. Nach 1-2 wöchigem Rollern konnten

auch aus den als negative Kontrolle gedachten Teströhrchen, die Bakterien in Normalmedium (NB bzw. YMB) enthielten, Rhizobien isoliert werden, die RP4 Moleküle mit Insertionen trugen. Die detaillierten Versuchsbedingungen sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

Die zu untersuchenden Stämme wurden bis zur log-Phase in YMB oder NB Medium angezogen, ein Aliquot in Minimalmedium mit Dextrin statt Glucose (Stressmedium) überimpft und bis zu 6 Wochen bei 30°C gerollert. Alle Röhrchen wurden mit Tesakreppband zugeklebt, um Kontaminationen zu verhindern. Trotzdem sind Kontaminationen bei einem Versuchszeitraum von 6 Wochen nicht auszuschließen. Deshalb wurden als weitere Kontrollen Stämme, die keine Genomumstrukturierung zeigen, *Xanthomonas badrii*, *Xanthomonas holcicola* und *E. coli* K12, sowie je ein unbeimpftes Röhrchen mit YMB, NB und MM+D (Minimalmedium + Dextrin) mitinkubiert und auf Kontaminationen überprüft. Während der gesamten Versuchsdauer wurden keine Kontaminationen festgestellt.

Jede Woche wurde aus jedem Ansatz eine Probe entnommen, auf Kontamination überprüft und auf YBM (bzw. NB) + Sm ausplattiert. Je 200 Kolonien wurden auf Ampicillin-, Kanamycin-, Neomycin- und Tetracyclinresistenz getestet. Bereits nach 1-2 Wochen konnten Kolonien mit phänotypisch verändertem Resistenzmuster des RP4 Plasmids isoliert werden. Ihr Anteil lag im Prozentbereich. Die Zahl der gewonnenen Mutanten war nach der zweiten Woche höher als nach der ersten, blieb dann aber für die restliche Versuchszeit relativ konstant. Tabelle 4 zeigt den Anteil der insgesamt erhaltenen Kolonien mit phänotypisch verändertem RP4 Resistenzmuster. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Insertio-

Stamm	A	K	N	T	N T	A N	A T	A K	A K T	K N T	A N T	A K N
2011	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 9	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MVII/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. leg. 300	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. jap.	-	-	-	-	-	-	30	70	-	-	-	-
R. trif.	68,5	-	-	-	-	31,5	-	-	-	-	-	-
R. phas.	9	6	1,5	-	-	0,5	7	-	-	-	-	-
A. tum. B6	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20-1	97	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-
18-23	43,5	-	3	2	3,5	-	18	-	3	6	21*	-
31-12	17,5	-	3	1	-	78,5	-	-	-	-	-	-
30-25	-	-	-	4	-	-	10	4	-	-	-	-
4-20	22,5	-	-	3	-	-	24	-	1	-	-	-
18-30	-	-	-	-	-	-	69	-	3	-	3*	-
18-31	-	-	-	3,5	1,5	-	2	-	-	-	-	-
31-18	-	-	1,5	1	3,5	-	-	-	-	69,5*	-	-
30-36	1	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	3*

Tab. 4: Anteil der Rhizobienkolonien mit phänotypisch verändertem Resistenzmuster des RP4 Plasmids nach Stressbehandlung in %. * = dieses Resistenzmuster deutet unter Berücksichtigung des natürlichen Resistenzmusters auf Plasmidverlust hin.

nen oder Deletionen im RP4 Molekül stattgefunden haben. Es fällt auf, daß besonders bei Standard Wildtypstämmen (= Wildtypstämme, die nicht durch Umstrukturierung entstanden sind) der Klasse I und II weniger Resistenzmutanten auftraten, als bei Stämmen, die durch Umstrukturierung isoliert worden waren. Dies wird besonders deutlich am Beispiel *A. tumefaciens* B6 (Phabagen Collection, Utrecht) und 18-23 (Umstrukturierung aus *R. meliloti* 20-1), 18-30 und 18-31 (Umstrukturierung aus *R. trifolii*).

Die gewählten Bedingungen führten im Versuchszeitraum nicht zu weiterer Genomumstrukturierung. Es konnten in keinem Ansatz Stämme anderer Klassen, als der Ausgangsklassen identifiziert werden.

3.5. Rücktransfer der RP4 Mutanten nach *E. coli*

RP4 Moleküle sind nach Insertion von ISR1 in *Rhizobium* nicht mehr stabil (U. Priefer, 1980). Erst durch Rücktransfer nach *E. coli* wird die deletierende Aktivität des ISR1 Elements inhibiert. RP4 Moleküle mit ISR1 Insertion konnten so stabilisiert und eingehend analysiert werden.

Von den erhaltenen Kolonien mit phänotypisch verändertem Resistenzmuster wurde daher eine repräsentative Anzahl ausgewählt und die mutierten RP4 Plasmide nach *E. coli* zurücktransferiert. Als Rezipienten dienten die *E. coli* Stämme C-600 Nx (nalidixinsäureresistent) und CSH56 Nx. Durch Gegenselektion mit Nalidixinsäure sollte das Wachstum der *Rhizobium*-Donoren verhindert werden. Von jeder Mutante wurden zwei Strichkreuzungen angelegt. Dabei wurde unabhängig vom phänotypischen Resistenzmuster der *Rhizobium*-Donoren

jeweils auf Nx + Km und Nx + Tc selektioniert. Dies war erforderlich, da die ersten Rückkreuzungsversuche gezeigt hatten, daß das phänotypische Resistenzmuster der Rhizobium-Donoren in den meisten Fällen nicht mit dem der E. coli RP4 Transkonjuganten übereinstimmt. Da die meisten Rhizobium-Donoren ampicillinsensitiv waren, wurde für die Selektion Kanamycin und Tetracyclin gewählt. Wuchsen in beiden Kreuzungsansätzen keine Transkonjuganten wurde die Kreuzung mit Selektion auf Ampicillin oder Neomycin wiederholt. Konnten in keinem Fall Transkonjuganten isoliert werden, wurden die RP4 Mutanten als transferdefekt (Tra^-) eingestuft. Da die Untersuchung der Tra^- Mutanten relativ umständlich ist, und genügend andere Mutanten zur Verfügung standen, wurde auf die Analyse der transferdefekten RP4 Mutanten verzichtet. Zeigten die Rhizobium-Donoren, wie z. B. bei 18-23, 18-30 und 31-18 das gleiche Resistenzmuster, das für den Stamm vor RP4 Transfer bestimmt wurde, und konnten keine E. coli Transkonjuganten erhalten werden, war dies ein ziemlich sicherer Hinweis auf den Verlust des RP4 Plasmids im entsprechenden Rhizobium-Donor. Das Ergebnis der Rückkreuzungen ist in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die Rückkreuzungen nach E. coli zeigten, daß viele Rhizobiumstämme durch die Stressbehandlung auch nalidixinsäureresistent geworden waren. Dieser Faktor erschwerte anfangs die Beurteilung der Kreuzungsergebnisse. Ein Nachtest aller Rhizobium-Donoren ergab, daß insgesamt 43,9% nalidixinresistent waren. In Kreuzungen mit diesen Donoren wurden die E. coli Transkonjuganten auf Grund ihrer Koloniemorphologie nach mehreren Einzelkolonienpassagen identifiziert.

Herkunfts- stamm	A	B	C.1	C.2	C	C.3	C.4	D	E	F
2011	44,2	0	100	25		4,3	95,7	55,8	0	13,5
E 9	80	0	100	62,5		50	50	20	0	30
MVII/1	30	0	100	50		33,3	66,6	70	0	20
R.leg.300	20	0	100	100		100	0	20	60	0
R. jap.	40	0	100	28,6		0	100	0	60	17,1
R.trif.	32,9	3,6	96,4	92,9		53,6	46,11	32,9	34,1	11,7
R.phas.	42,1	0	100	75		25	75	31,5	26,3	21,1
A.tum.B6	67,4	0	100	100		51,6	48,3	23,9	8,3	15,2
20-1	46,7	14,3	85,7	16,7		16,7	66,6	20	33,3	13,3
18-23	64,5	10	90	15		15	75	0	35,5	32,3
31-12	42,2	10	90	0		71,4	34,6	3,4	54,4	31,03
30-25	50	50	50	0		25	75	25	25	37,5
4-20	64,1	16	84	80		76	24	5,1	30,7	15,4
18-30	45,8	9,1	90,9	72,7		63,6	40,4	0	54,4	20,8
18-31	69,1	10	90	27,6		27,6	62,4	0	30,9	20,1
31-18	30,7	12,5	87,5	0		73,4	32,5	7,6	61,7	19,2
30-36	50	50	50	25		25	75	25	25	25

Tab. 5: Übersicht über die Resistenzen der Transkonjuganten

nach Rücktransfer der RP4 Mutanten nach E. coli

A = Zahl der erhaltenen Transkonjuganten in %

B = Zahl der Transkonjuganten mit gleichem Resistenzmuster wie die Rhizobium-Donoren in %

C = Aufgliederung der Transkonjuganten mit von den Rhizobium-Donoren verschiedenen Resistenzeigenschaften

C.1 = Zahl der Transkonjuganten mit anderem Resistenzmuster als die Rhizobium-Donoren in %

C.2 = Ampicillinrevertanten in %

C.3 = Revertanten, die wieder alle RP4 spezifischen Resistenzen exprimieren in %

C.4 = verbliebene RP4 Mutanten in %

D = transferdefekte RP4 Plasmide in %

E = Plasmidverlust der Donoren in %

F = Prozentsatz der erhaltenen RP4 Mutanten in %, bezogen auf alle untersuchten Rhizobienkolonien des jeweiligen Stammes

Die meisten E. coli Transkonjuganten zeigen ein anderes RP4 Resistenzmuster, als die Rhizobiendonoren. Dies wird bei Klasse I und II Wildtypstämmen, die nicht durch Stress isoliert worden waren, besonders deutlich. Von fast allen ampicillinsensitiven Rhizobiumdonoren wurden resistente Transkonjuganten erhalten. Die Anzahl der Revertanten, d.h. Transkonjuganten, die wieder alle 4 RP4 spezifischen Resistenzen exprimierten, war unerwartet hoch (s. Tab. 5). Insgesamt betrug die durchschnittliche Reversionsrate 41,9%. Bei der weiteren Charakterisierung der Transkonjuganten, zeigte sich außerdem, daß ein großer Teil der RP4 Mutanten auch in E. coli nicht stabil war. Bei Resistenzkontrollen der isolierten Transkonjuganten wies ein großer Prozentsatz erneut ein verändertes Resistenzmuster auf.

3.6. Stabilität des Resistenzmusters in E. coli

Die erhaltenen E. coli Transkonjuganten mit verändertem RP4 Resistenzmuster wurden anfangs auf PA ohne Antibiotika später auf Selektionsplatten bei 4°C aufbewahrt. Während weitere Analysen, wie elektronenmikroskopische Längenmessung und Untersuchung der Restriktionsmuster der RP4 Mutanten durchgeführt wurden, wurde auch das Antibiotikaresistenzmuster mehrmals überprüft. Dabei zeigte sich, daß die ursprünglich bestimmten Resistenzmuster auch in E. coli nicht stabil waren. Die höchste Instabilität zeigten Stämme, die nicht auf Selektionsplatten aufbewahrt wurden. Bei ca 30% der Stämme kam es zum Verlust der veränderten RP4 Plasmide. Durch Haltung der Stämme auf spezifischen Selektionsplatten (d.h. Platten, mit einer Antibiotikakombination, die dem phänotypischen Resistenzmuster der Stämme entspricht), konnte die Instabilität und damit der Verlust von Mutanten zwar verringert, aber nicht völlig verhindert werden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über das Resistenzbild der E. coli Transkonjuganten 12 Wochen nach Isolierung.

Herkunft der E. coli	A	B	C	D	E
Transkonjuganten					
R. mel. 2011	0	47,6	0	52,4	52,4
R. mel. E9	54,5	18,2	0	27,2	27,2
R. mel. MVII/1	42,9	14,3	14,3	28,6	42,9
R. leg. 300	100	0	0	0	0
R. jap.	0	50	16,6	33,3	49,9
R. trif.	47,6	14,3	23,8	14,3	38,1
R. phas.	28,6	0	14,3	57,1	71,4
A. tum. B6	54,4	12,5	30,2	3,1	33,3
R. mel. 20-1	33,3	22,2	0	66,7	66,7
18-23	30	10	0	60	60
31-12	57,1	14,3	14,3	14,3	28,6
30-25	50	0	25	25	50
4-20	33,3	0	0	66,6	66,6
18-30	25	18,8	12,5	43,6	56,25
18-31	28,6	14,3	14,3	42,9	57,2
31-18	23,5	17,6	11,8	47,1	58,6
30-36	50	0	0	50	50

Tab. 6: Überblick über das Resistenzmuster der E. coli Transkonjuganten

12 Wochen nach Isolierung

A = Revertanten, die wieder alle RP4 spezifischen Resistenzen exprimieren in %

B = Plasmidverlustrate in %

C = Transkonjuganten mit gleichgebliebenem Resistenzmuster in %

D = Transkonjuganten mit verändertem Resistenzmuster in %

E = verbliebene RP4 Mutanten in %

In dieser Karte wird für das RP4 Plasmid eine Gesamtlänge von 60 kb angegeben. Für die vorliegende Arbeit war, um einen Eichwert der RP4 Länge für die Auswertung der Heteroduplexmoleküle zu erhalten, ebenfalls eine Längenmessung des RP4 Plasmids im Elektronenmikroskop durchgeführt worden. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde eine statistische Länge von 57,95 kb für RP4 ermittelt (s. Tab. 7). Dieser Wert stimmt auch gut mit der von Burkardt (Burkardt et al., 1979) gemessenen Länge von 57,4 kb überein. Für die Fragmentgrößenbestimmung der Restriktionsanalysen wurde daher ein Größenumrechnungsfaktor bestimmt und eingesetzt.

Zahl d. gemess. Moleküle	Länge in kb	Standardabw. in kb	Standardabw. in %
31	57,95	$\pm 0,27$	$\pm 0,5$

Tab. 7: Längenmessung des RP4 Plasmids

Die genetische Karte des RP4 Plasmids wurde von U. Priefer (1980) übernommen (s. Abb. 18).

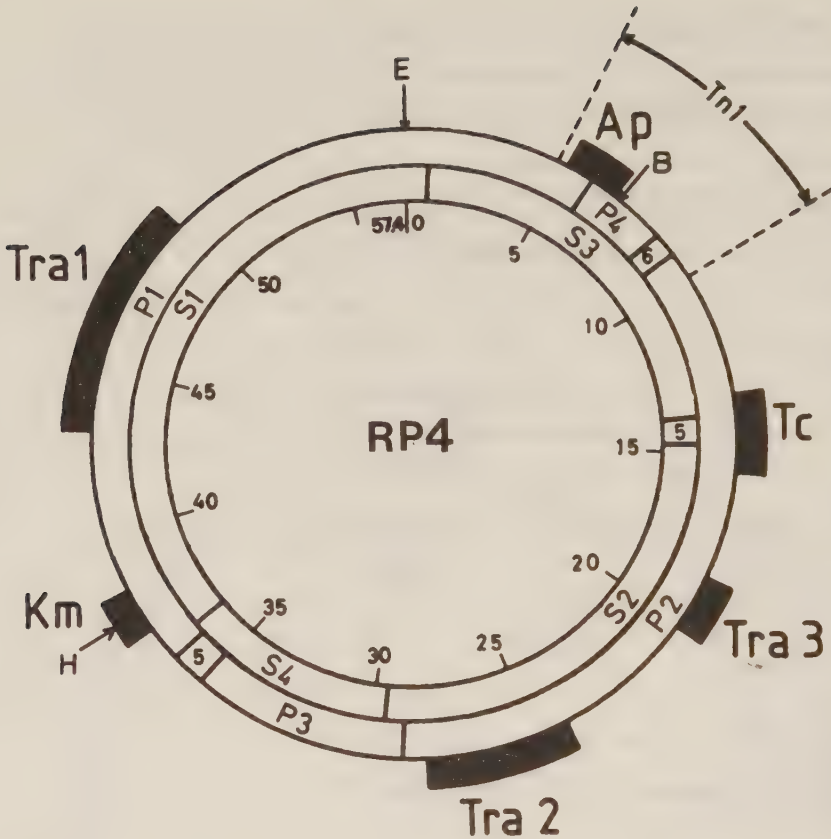


Abb. 18: Genetische Karte des RP4 Plasmids nach U. Priefer (1980).

Die Lokalisation der Resistenzdeterminanten und Transferregionen sind Arbeiten von Figurski et al. (1976), Stanisich und Bennet (1976), Holloway (1979) und Barth (Barth und Grinter, 1977a, 1977b; Barth et al. 1978; Barth, 1979) entnommen. Der Karte liegt eine Länge von 57,4 kb zu Grunde (Burkardt et al. 1979).

Ap, Km und Tc stehen für die Genregionen, die für Ampicillin, Kanamycin/Neomycin und Tetracyclin codieren. RP4 besitzt drei Transferregionen, die für den Plasmidtransfer verantwortlich sind (Tra1, Tra2

und Tra3.

Das Ampicillintransposon Tn1 hat eine Länge von 4,8 kb (Heffron et al., 1975a,b).

Die zwei konzentrischen Kreise geben die Lage der SmaI bzw. PstI Fragmente des RP4 Plasmids an. Außerdem sind die jeweils nur einmal vorhandenen Schnittstellen für EcoRI, BamHI und HindIII durch Pfeile markiert.

4.2. Analyse gereinigter Plasmid DNA der RP4 Mutanten

4.2.1. Restriktionsanalyse

Es wurde zunächst versucht, die Plasmid DNA der RP4 Mutanten tragenden Stämme mittels Schnelllyse zu gewinnen und für die Restriktionsanalysen einzusetzen. Hierfür wurden verschiedene Verfahren zur Minipräparation (D. S. Holmes u. M. Quigley, 1981; H. C. Birnboim u. J. Doly, 1979; D. Ish-Horowicz u. J. F. Burke, 1981) versucht. Keine der angewendeten Methoden führte zu einer sicheren, reproduzierbaren Menge an RP4 Plasmid DNA. Das RP4 Plasmid ist durch seine Größe und Kopienzahl (max. 3 pro Zelle) für diese Verfahren ungeeignet. Deshalb wurden interessante Plasmidmutanten über CsCl/EtBr Dichte zentrifugation gereinigt.

Die erhaltene Plasmid DNA wurde dann mit SmaI und PstI verdaut, da diese Enzyme relativ viele Schnittstellen im RP4 Molekül aufweisen.

Die untersuchten RP4 Mutanten sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Bis auf zwei Mutanten zeigte keines der isolierten Plasmide eine Veränderung im SmaI-und PstI Restriktionsmuster,

E. coli Trans- konjugante	Herkunft	Resistenzmuster im Rhizobiaceae Donor	Resistenzmuster im E. coli Transkonj.	Ergebnis der Spaltung mit SmaI
SR21	4-20	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
SR11	18-23	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
SR48	18-30	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
SR65	31-12	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	ø
SR123	4-20	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	A ⁻ K ⁻ N ⁻ T ⁺	ø
SR80	31-12	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	ø
SR36	30-25	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁻ K ⁻ N ⁻ T ⁺	+
SR62	31-12	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	A ⁻ K ⁻ N ⁻ T ⁺	ø
SR15	18-23	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	ø
SR12	4-20	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
SR24	30-25	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	ø
SR79	31-12	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁻	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	+
SR146	4-20	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	ø
CSHR107	A.tum.B6	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR40	R.phas.	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR70	MVII/1	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR238	R.mel.E9	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR163	R.trif.	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁻	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR108	A.tum.B6	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR84	MVII/1	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR48	R.phas.	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø
CSHR242	R.mel.E9	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	ø

E. coli Trans- konjugante	Herkunft	Resistenzmuster im Rhizobiaceae Donor	Resistenzmuster im E. coli Transkonj.	Ergebnis der Spaltung mit
			PstI	SmaI
CSHR214	R.mel.2011	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁻ K ⁻ N ⁻ T ⁺	∅
CSHR244	R.mel. E9	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁻ K ⁺ N ⁻ T ⁻	∅
CSHR99	A.tum.B6	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁻ T ⁺	∅
CSHR258	R.mel.2011	A ⁻ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	∅

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Restriktionsanalyse verschiedener RP4 Mutanten mit den Restriktionsenzymen PstI und SmaI.

∅ = Keine Veränderung der Restriktionsmusters gegenüber dem RP4 Ausgangsplasmid

+ = Veränderung des Restriktionsmusters gegenüber dem RP4 Ausgangsplasmid

obwohl die meisten eine phänotypische Veränderung des Resistenzmusters aufweisen.

Unterschiede im Spaltmuster konnten erst nach Verwendung von Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenz nur 4 Basen lang ist, wie AluI oder HaeIII, festgestellt werden. Die so erhaltenen Restriktionsmuster sind aber auf Grund der Vielzahl der entstehenden Restriktionsfragmente nicht zur Kartierung der RP4 Mutanten geeignet.

Dieses Ergebnis wird verständlich, wenn man die Größe der meisten SmaI bzw. PstI Fragmente des RP4 Moleküls berücksichtigt. Sie liegen fast alle in einer Größenordnung, bei der die Insertion eines klassischen IS-Elements (ca. 1-2 kb) im Agarosegel nicht mehr identifiziert werden kann, wenn es keine eigene SmaI oder PstI Schnittstelle besitzt. Deshalb wurde die Länge einiger "unauffälliger" Plasmidmutanten im Elektronenmikroskop bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 9 zusammengefaßt.

RP4-Mutante aus E. coli	Herkunft	gem. Länge in kb	S in kb	S in %	Differenz zu RP4 in kb
CSHR238	R.mel.E9	59,0	0,81	1,4	+1,05
CSHR258	R.mel.2011	59,51	1,15	2,6	+1,56
CSHR99	A.tum.B6	53,08	2,51	4,7	-4,87
CSHR242	R.mel.E9	57,3	1,56	2,7	-0,65
CSHR244	R.mel.E9	97,47	1,04	1,1	+39,52
CSHR214	R.mel.2011	94,18 u. 58,3	1,3/0,8	1,4/1,4	+36,32/+0,58
CSHR48	R.phas.	99,7 u. 59,94	1,5/1,63	1,5/2,7	+41,75/+1,99
CSHR70	R.mel.MVII/1	88,54 u. 58,59	9,5/0,65	8,8/1,1	+30,53/+0,64

-99-

Tab. 9: Ergebnis der elektronenmikroskopischen Längenmessung verschiedener RP4 Mutanten, die im SmaI und PstI Spaltmuster keinen Unterschied zu RP4 (Länge: 57,95 kb) aufweisen.

S = Standardabweichung

Das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Längenmessung verschiedener RP4 Mutanten, die im SmaI und PstI Spaltmuster keinen Unterschied zum Ausgangsplasmid aufweisen, zeigt, daß auch bei diesen Mutanten Längendifferenzen zum RP4 Plasmid bestehen.

Auffallend ist das Vorhandensein von zwei Plasmid-Längenklassen in den Stämmen CSHR214, CSHR48 und CSHR70. Da die von diesen Mutanten erhaltenen Restriktionsmuster dem des Ausgangsplasids identisch sind, kann man eine Mobilisierung von Rhizobienplasmiden nach E. coli bei der Rückkreuzung ausschließen. Außer R. meliloti MVII/1 besitzt keiner der Rhizobiumherkunftstämmen ein Plasmid in der fraglichen Größe (D. Horn, 1981; K. Pfeleiderer, 1983).

Da die RP4 Mutanten aus SR36 und SR24 die deutlichsten Insertionen im SmaI und PstI Restriktionsmuster erkennen ließen, wurden diese beiden Plasmide einer eingehenden Analyse unterzogen.

5. Charakterisierung der beiden Insertionsmutanten

SR36 (RP4::ISR2) und SR24 (RP4::ISR3)

Die beiden Insertionsmutanten SR36 (RP4::ISR2) und SR24 (RP4::ISR3) waren die einzigen von 28 untersuchten RP4 Mutanten, die im SmaI- und PstI Spaltmuster eine deutliche Veränderung gegenüber dem Ausgangsplasmid zeigten.

Die Bezeichnung ISR2 und ISR3 wird verwendet, da die genetische Isolierung der beiden Insertionen ein starker Hinweis für ihre Translocierfähigkeit ist, und die folgenden Versuche bestätigen, daß es sich tatsächlich um Insertionselemente handelt.

Beide Insertionselemente stammen aus der Klasse III (Nif-Typ) des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae.

5.1. Dichtebestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge

Dieser Versuch sollte zeigen, ob durch die Insertion von Rhizobien DNA die Dichte des RP4 Plasmids von 1,7192 g/ml verändert wurde.

Für die Dichtebestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge wurde über CsCl/EtBr Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Plasmid DNA der Stämme SR36 und SR 24 verwendet. Das Ergebnis der Dichtebestimmung ist Tabelle 10 zu entnehmen. Die erhaltenen Dichteprofile sind in Abbildung 19 dargestellt.

Plasmid	Dichte in g/ml	GC-Gehalt in %
RP4::ISR2	1,7189	60,1
RP4::ISR3	1,7194	60,6

Tab. 10: Ergebnis der Dichtebestimmung der RP4 Insertions-
mutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3.

Die Dichteunterschiede zum RP4 Plasmid sind nur geringfügig und daher schwer zu bewerten. Die zulässige Abweichung in der Messgenauigkeit beträgt bei dieser Methode ± 5 an der vierten Stelle nach dem Komma. Das bedeutet, daß RP4::ISR2 und RP4::ISR3 keinen signifikanten Dichteunterschied zu RP4 zeigen.

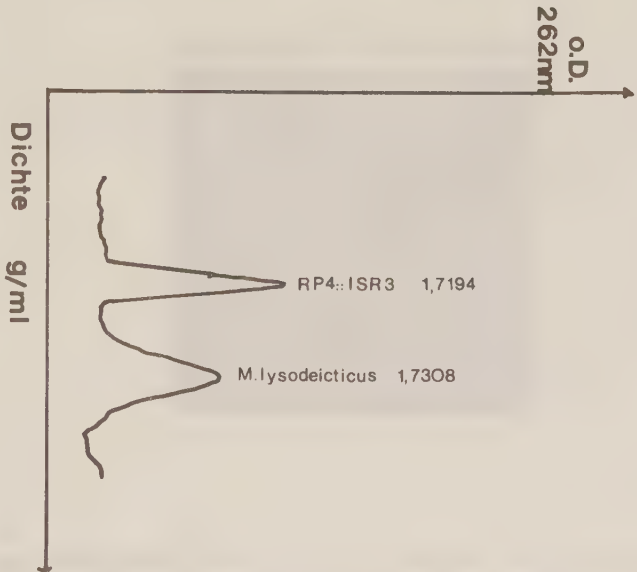
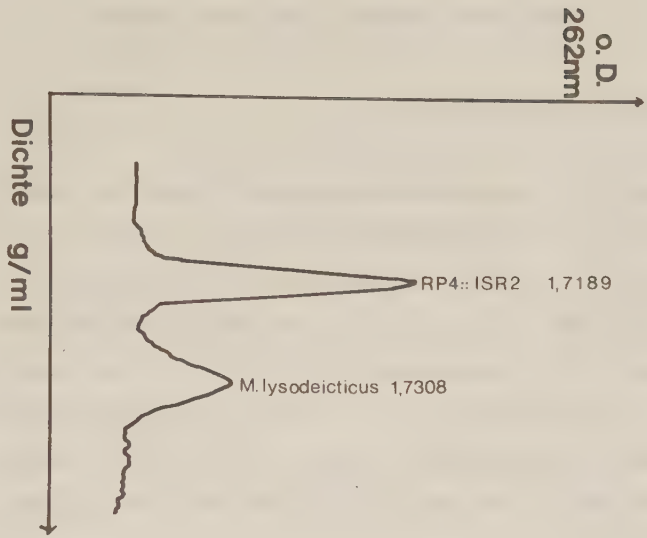


Abb. 19: Dichteprofile der RP4 Insertionsmutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3 nach CsCl-Dichtegradienten-zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge.
Als Referenz DNA wurde *Micrococcus lysodeicticus* DNA verwendet.

5.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

5.2.1. Längenmessung

Für die elektronenmikroskopische Längenbestimmung wurde über CsCl/EtBr Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Plasmid-DNA der RP4 Insertionsmutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3 nach dem Dropletverfahren präpariert. Das Ergebnis ist in Tabelle 11 zusammengefaßt. Da die von RP4::ISR2 erhaltenen Plasmidpräparationen nicht immer identische SmaI und PstI Restriktionsmuster ergaben (s. Abb. 20) wurden von dieser Mutante verschiedene Plasmidpräparationen gemessen.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

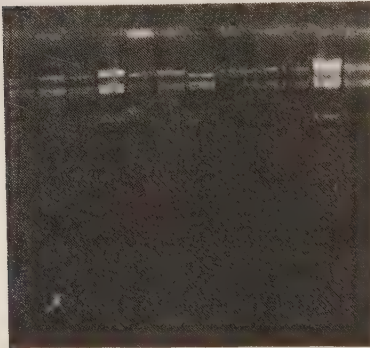


Abb. 20 : Die Spuren 1 - 6 und 8-12 zeigen eine SmaI Spaltung von 11 verschiedenen Präparationen von RP4::ISR3. Spur 7 enthält das Ausgangs-RP4 Plasmid mit SmaI verdaut. Die einzelnen Plasmid-Präparationen unterscheiden sich nur dadurch, daß für die Anzucht jeweils verschiedene Einzelkolonien eingesetzt wurden.

Plasmid	Zahl d. gem. Moleküle	gemessene Länge in kb	Standardabweichung in kb	Differenz zu RP4 in kb
RP4::ISR2, Präp. 1	22	64,63	1,29	+6,68
	8	56,15	0,6	-1,8
	4	57,91	0,65	-
	2	59,23	0,35	+1,28
RP4::ISR2, Präp. 4	6	63,1	0,68	+5,15
	18	58,3	2,26	+0,35
RP4::ISR2, Präp. 12	6	63,95	1,9	+6,0
	14	43,31	1,02	-14,64
RP4::ISR2, Präp. 14	12	64,5	1,42	+6,55
RP4::ISR3	28	65,24	0,7	+7,29

Tab. 11: Ergebnis der Längenmessung von RP4::ISR2 und RP4::ISR3

Von RP4::ISR2 wurden verschiedene DNA Präparationen vermessen, da festgestellt wurde, daß manche Plasmid Präparationen von RP4::ISR2 ein etwas unterschiedliches Spaltmuster für SmaI und PstI zeigten. Derartige Unterschiede konnten für RP4::ISR3 nie nachgewiesen werden.

Die elektronenmikroskopische Längenmessung zeigt noch deutlicher als die Restriktionsanalyse die Heterogenität verschiedener Plasmidpräparationen von RP4::ISR2. Drei der vermessenen Plasmid Isolierungen wiesen eine hohe Längenvariabilität von RP4::ISR2 auf. Diese Variabilität nahm mit der Zeit ab, d.h. spätere Plasmidpräparationen zeigten zunehmend weniger Heterogenität. Die einzige DNA Isolierung, die homogen nur eine Plasmidgröße aufwies, war zeitlich eine der letzten Präparationen. Da diese Plasmidpräparation völlig einheitlich war, wurden die hier erhaltenen Werte weiter verwendet. Die abnehmende Längenheterogenität spricht für eine allmähliche Stabilisierung des Plasmids RP4::ISR2. Ob ein unmittelbarer Zusammenhang zur Translocation von ISR2 besteht, bedarf weiterer Aufklärung.

Für RP4::ISR2 ergibt sich damit eine Gesamtlänge von 64,5 kb, und für ISR2 eine Länge von 6,5 kb.

Bei RP4::ISR3 konnten nie heterogene Plasmidpräparationen nachgewiesen werden. Für RP4::ISR3 wurde eine Gesamtlänge von 65,24 kb, und für ISR3 eine Länge von 7,29 kb ermittelt.

5.2.2. Heteroduplex- und Homoduplexanalyse

Ziel dieser Experimente war die Darstellung und Lokalisation der Insertionen in RP4::ISR2 und RP4::ISR3. IS-Elemente und Transposonen werden von invertierten, repetitiven Sequenzen flankiert. Diese Sequenzen können in Hetero- und Homoduplexanalysen dargestellt werden.

Für die Heteroduplexversuche wurde RP4 - und RP4::ISR2 DNA bzw. RP4::ISR3 DNA im Verhältnis 1:1 zusammengegeben, denaturiert, und anschließend renaturiert. Für die Homoduplex-

experimente wird nur jeweils eine Plasmidspezies eingesetzt. Beim Heteroduplexversuch werden dabei in statistischer Häufigkeit außer den Elternplasmiden auch Heteroduplexmoleküle gebildet, die aus je einem Strang der ursprünglichen Plasmide bestehen. Solche Moleküle sind durch das Auftreten von einzelsträngigen Schleifen, die auf Insertion oder Deletion in dem entsprechenden Elternstrang hinweisen, und einzelsträngigen Blasen, die zeigen, daß an dieser Stelle keine Homologie vorliegt, gekennzeichnet. Doppelstrangbildung entsteht nur, wenn homologe Sequenzen vorhanden sind. Die Insertion eines Transposons oder IS-Elements ist entweder an einer Einzelstrangschleife in einem Heteroduplexmolekül oder durch Ausbildung einer charakteristischen Transposonstruktur im Homoduplexmolekül zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Versuche parallel mit Tris-Formamid- und Carbonatspreitung durchgeführt. Die Carbonatspreitung bietet eine bessere Unterscheidungsmöglichkeit von Doppel- und Einzelsträngen, ist aber empfindlicher gegenüber Spuren von Detergenzien oder erhöhter EDTA Konzentration im Spreitungsansatz (R. Lurz, 1983; D. Kapp, 1983). Für diese Versuche wurde die DNA daher über Elu-Tip-d Minisäulen gereinigt. In den Abbildungen 21 und 22 wird der Unterschied zwischen Tris-Formamid- und Carbonatspreitung am RP4 Plasmid und an der charakteristischen Transposonstruktur des Transposons Tn1 im RP4 Homoduplex verdeutlicht.

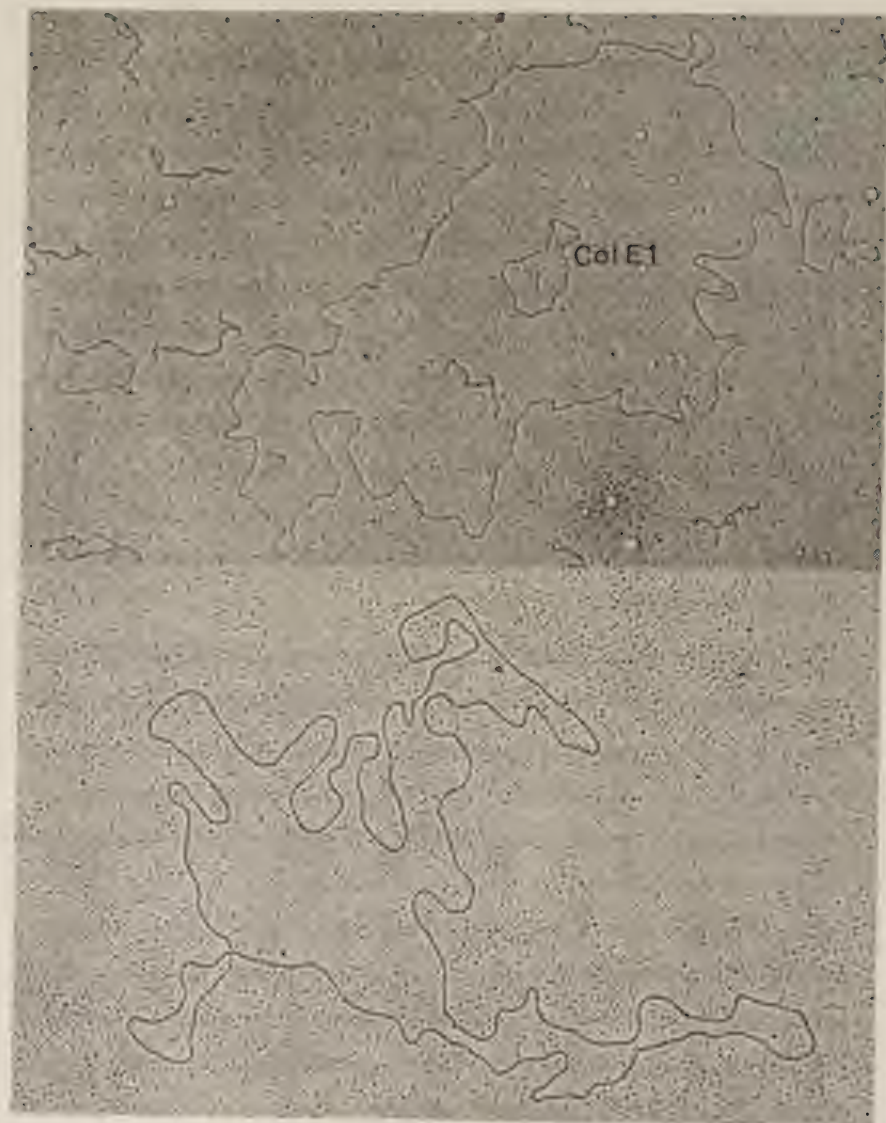


Abb. 21: oben) RP4 Molekül Tris-Formamid gespreitet, mit
ColE1 als internem Standard
unten) RP4 Molekül nach Carbonatspreitung

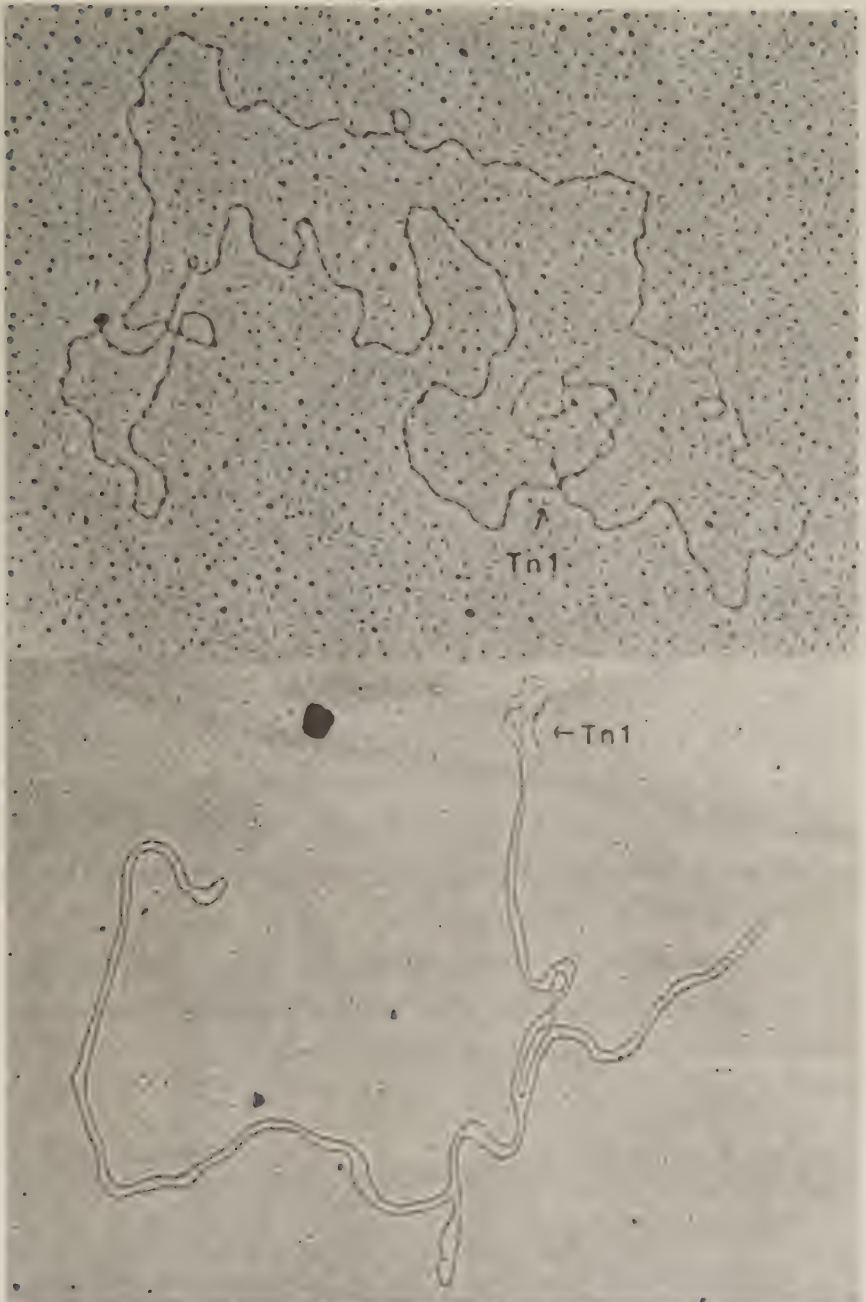


Abb. 22: Homoduplex von RP4 mit Ausbildung der für Tn1
charakteristischen Transposonstruktur
oben) Tris-Formamid-Spreitung
unten) Carbonatspreitung

Das Transposon Tn1 des RP4 Plasmids ist ein sehr guter Bezugspunkt für die Auswertung der erhaltenen Hetero- und Homoduplexmoleküle. Ausgehend von der charakteristischen Struktur des Transposons Tn1 kann der Insertionsort von ISR2 und ISR3 bestimmt werden.

Heteroduplexversuche

a) RP4 x RP4::ISR2

Alle weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden vorwiegend mit der Plasmidpräparation 14 durchgeführt, da diese Präparation die geringste Längenheterogenität aufwies.

Die erhaltenen Heteroduplexmoleküle wiesen genau die erwarteten Strukturen auf: die Transposonstruktur von Tn1 und eine Einzelstrangschleife, deren Länge ziemlich gut mit dem in der Längenmessung für ISR2 ermittelten Wert übereinstimmt. Abb. 23 zeigt ein typisches Heteroduplexmolekül von RP4 mit RP4::ISR2.

Das Ergebnis der Abstandsbestimmung von Tn1 zu ISR2 und der Größenbestimmung von ISR2-Einzelstrangschleife ist in Tab. 12 zusammengefaßt.

Zahl d. ausgewerteten Moleküle	Abstand Tn1-ISR2 in kb	S in kb	Länge ISR2 in kb	S in kb
11	9,26	0,3	6,5	0,54

Tab. 12: Ergebnis der Auswertung des Heteroduplexversuchs von RP4 mit RP4::ISR2

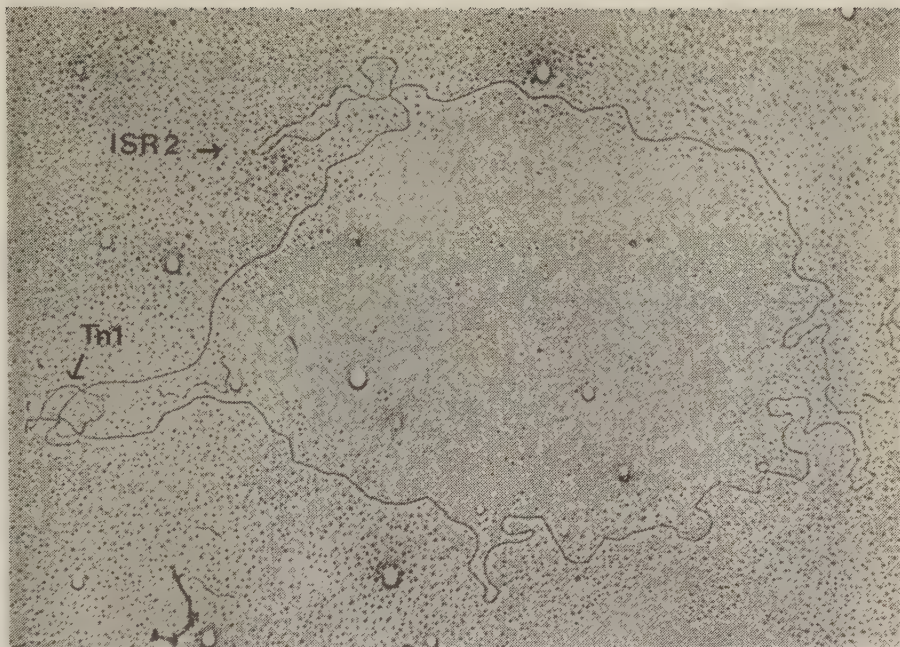


Abb. 23: Heteroduplexmolekül von RP4 mit RP4::ISR2
(Tris-Formamid Spreitung)

Damit konnte die Insertion von ISR2 im Abstand von 9,26 kb rechts oder links von Tn1 lokalisiert werden. Da auf Grund des Resistenzmusters keine Angaben über den Insertionsort von ISR2 möglich sind, konnte die genaue Orientierung nur durch die Restriktionsanalyse geklärt werden.

b) RP4 x RP4::ISR3

Bei ISR3 läßt sich der Insertionsort direkt durch Heteroduplexanalyse bestimmen, da auf Grund des Resistenzmusters nur eine Orientierung möglich ist. ISR3 ist in der Tetra-cyclinresistenz inseriert. Daher kommt nur eine Lokalisation rechts von Tn1 in Betracht.

Abb. 24 zeigt ein charakteristisches Heteroduplexmolekül von RP4 mit RP4::ISR3. Das Ergebnis der Heteroduplexauswertung ist in Tab. 13 zusammengefaßt.

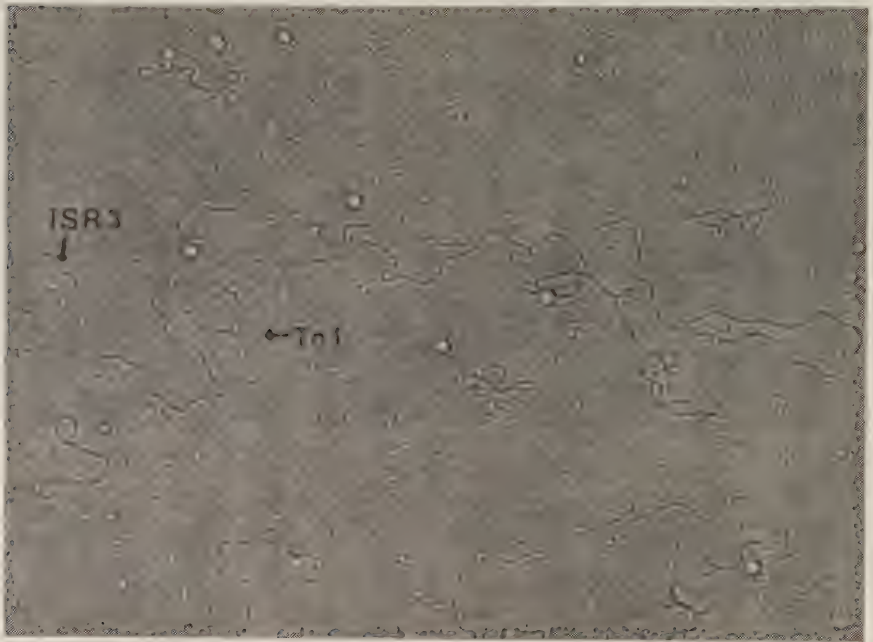


Abb. 24: Heteroduplexmolekül RP4 x RP4::ISR3
(Tris-Formamid Spreitung)

Zahl d. ausgewer- teten Moleküle	Abstand Tn1-ISR3 in kb	S in kb	Länge ISR3 in kb	S in kb
7	1,8	0,29	7,1	0,17

Tab. 13: Ergebnis der Auswertung des Heteroduplexversuchs
von RP4 mit RP4::ISR3

c) Heteroduplexversuch mit BglII gespaltener RP4- und RP4::ISR3

DNA

Durch Restriktionsanalyse konnte gezeigt werden, daß ISR3 keine BglII Schnittstelle enthält. Das Restriktionsenzym BglII schneidet RP4 nur einmal. Die Schnittstelle liegt kurz vor der Tetracyclinresistenz. BglII ist also für eine noch genauere Lokalisation der ISR3 Insertion gut geeignet. Das Heteroduplexexperiment mit BglII verdauter RP4 - und RP4::ISR3 DNA ergab, daß die Insertion von ISR3 1,16 kb rechts von der BglII Schnittstelle liegt.

Homoduplexanalyse

Für beide Insertionen konnte in diesem Versuch eine charakteristische Transposonstruktur gezeigt werden. Abb. 25 zeigt ein Homoduplexmolekül von RP4::ISR2.

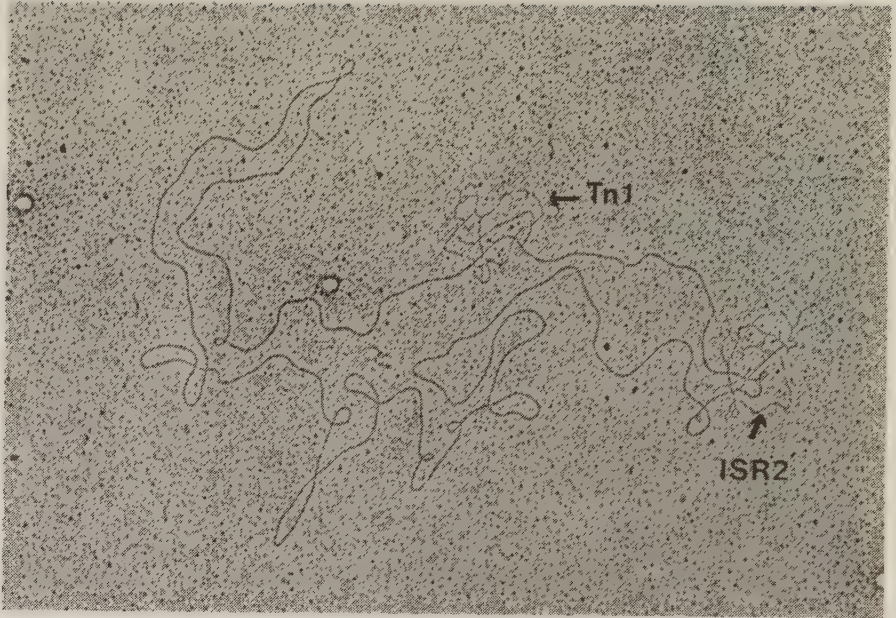


Abb. 25: Homoduplexmolekül von RP4::ISR2
(Carbonatspreitung)

5.3. Restriktionsanalyse von ISR2 und ISR3

5.3.1. PstI und SmaI Spaltung von ISR2 und ISR3

Der Insertionsort von ISR3 war durch Resistenzmuster und Heteroduplexversuch bereits genau lokalisierbar. Für ISR2 ergaben sich nach den elektronenmikroskopischen Daten zwei mögliche Insertionorte, 9,26 kb rechts oder links von Tn1. Die PstI und SmaI Spaltungen zeigen nun auch den Insertionsort für ISR2 (Abb. 26 und 27). Der elektronenmikroskopisch bestimmte Insertionsort für ISR3 wurde bestätigt.

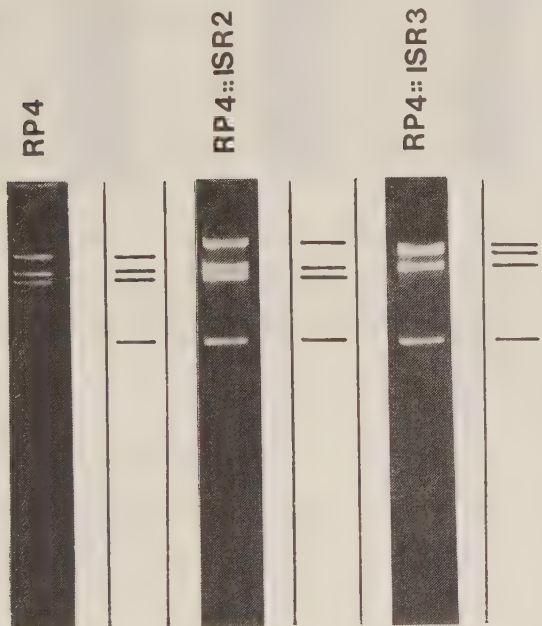


Abb. 26: SmaI Spaltung von RP4, RP4::ISR2 und RP4::ISR3

Elektrophoresebedingungen: 0,6% Agarose, 15V, 12h
Die genaue Länge der Fragmente ist Tab. 14 zu entnehmen.

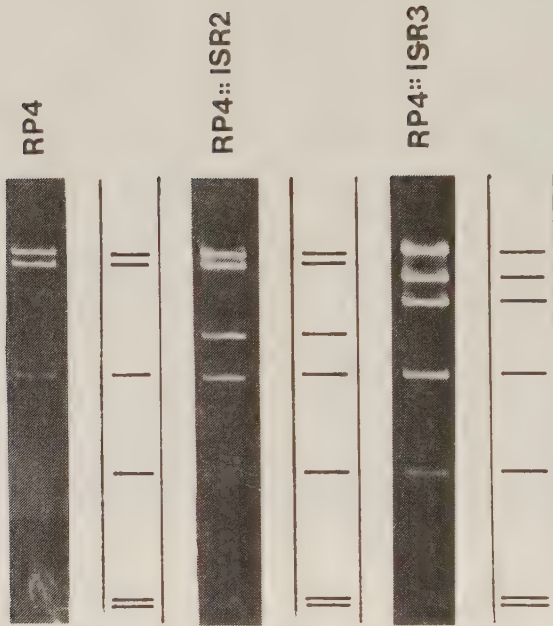


Abb. 27: PstI Spaltung von RP4, RP4::ISR2 und RP4::ISR3

Elektrophoresebedingungen: 0,8% Agarose, 15V, 12H
Die genaue Länge der Fragmente ist Tab. 14 zu entnehmen.

RP4	<u>PstI</u>		RP4	<u>SmaI</u>	
	RP4::ISR2	RP4::ISR3		RP4::ISR2	RP4::ISR3
27,2	24,1	27,2	20,2	26,8	20,2
21,04	21,04	15,9	15,15	15,15	20,06
6,17	9,5	12,4	13,4	13,4	15,15
2,7	6,17	6,17	7,3	7,3	7,3
1,4	2,7	2,7	0,96	0,96	0,96
0,6	1,4	1,4			
	0,6	0,6			

Tab. 14: Länge der PstI und SmaI Restriktionsfragmente in kb
von RP4, RP4::ISR2 und RP4::ISR3

Daraus ergibt sich für ISR2 folgende Lokalisation: ISR2 ist in das PstI Fragment P1 inseriert. Das stimmt mit der SmaI Spaltung überein, die das SmaI S1 Fragment als Lokalisation angibt (s. Abb. 28).

ISR2 besitzt eine PstI Schnittstelle, die das RP4 P1 Fragment in ein 24,1 kb und ein 9,5 kb Fragment teilt. Dabei muß sich das neu entstandene PstI 9,5 kb Fragment direkt an das RP4 P4 Fragment anschließen, da die Insertion von ISR2 durch die elektronenmikroskopischen Daten auf 9,26 kb Entfernung von Tn1 festgelegt werden konnte. Der PstI Schnitt muß sich demnach ziemlich am Rand von ISR2 befinden.

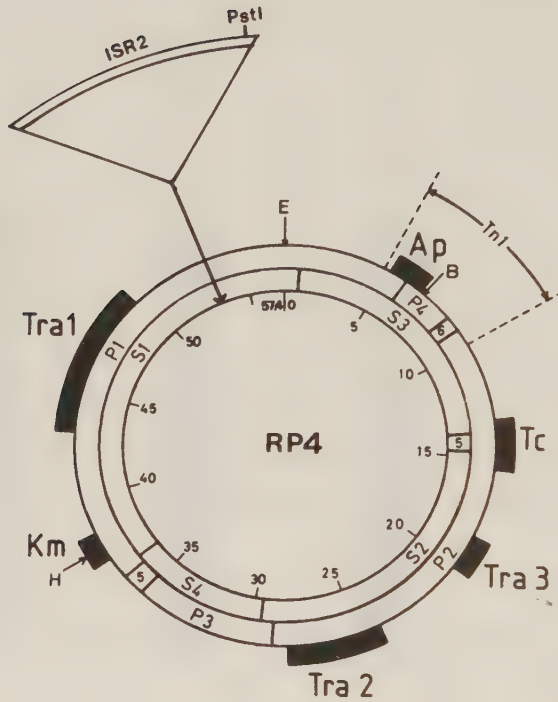


Abb. 28: Lokalisation der Insertion von ISR2

Für ISR3 konnte der Insertionsort im RP4 PstI Fragment P2 und im SmaI Fragment S3 gezeigt werden, was die elektronenmikroskopischen Daten bestätigt (s. Abb. 29).

ISR3 besitzt ebenfalls keine SmaI Schnittstelle, aber eine PstI Erkennungsstelle, die das P2 Fragment in ein 15,9 kb und ein 12,4 kb Fragment teilt. Die SmaI Verdauung zeigt, daß die Insertion von ISR3 im SmaI S3 Fragment liegt. Deshalb

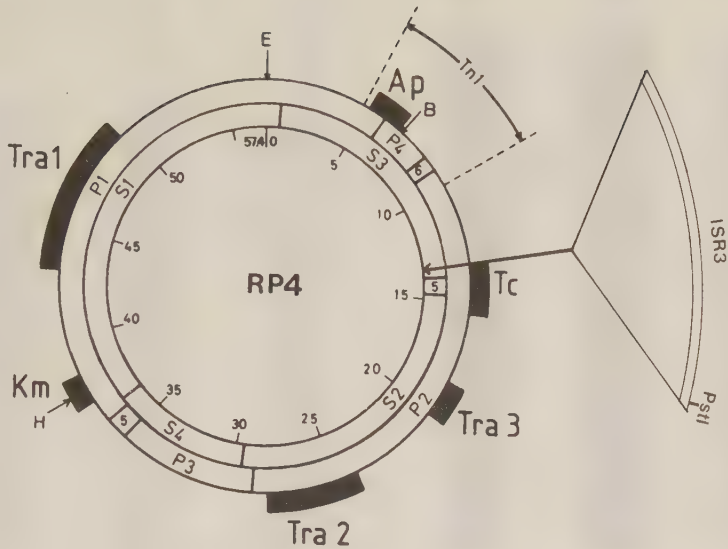


Abb. 29: Lokalisation der Insertion von ISR3

muß die PstI Schnittstelle ebenfalls relativ weit am Ende von ISR3 liegen, um ein PstI- PstI Fragment von 12,4 kb zu erzeugen.

5.3.2. Kartierung von ISR2 und ISR3 mit verschiedenen Restriktionsenzymen

Durch Einzel- und Doppelspaltungen mit den Enzymen EcoRI, HindIII, BamHI, SalI, BglII und MluI wurde von beiden Insertionselementen eine Restriktionskarte aufgestellt. Abb. 30 und 31 zeigen einige Beispiele dieser Spaltungen. Die Größen der Fragmente sind Tab. 15 zu entnehmen.

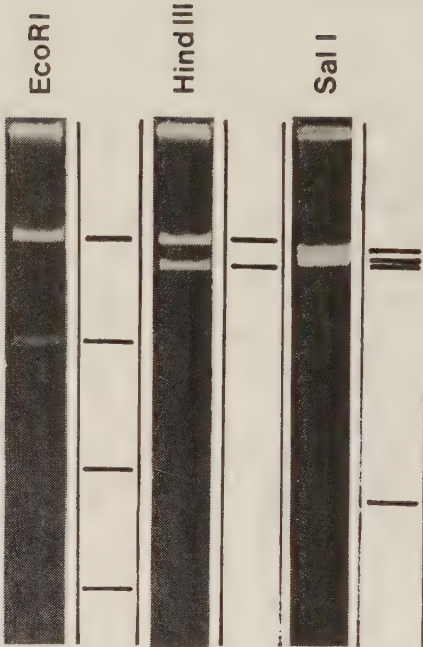


Abb. 30a: EcoRI, HindIII und SalI Spaltung von RP4::ISR2
Elektrophoresebed.: 0,8% Agarose, 15V 12h;

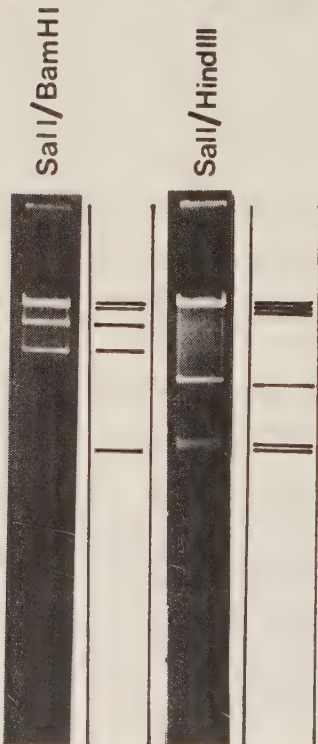


Abb. 30b: SalI/BamHI und SalI/HindIII
Doppelspaltung von RP4::ISR2
Elektrophoresebed.: 1,2% Agarose, 15V, 12h;

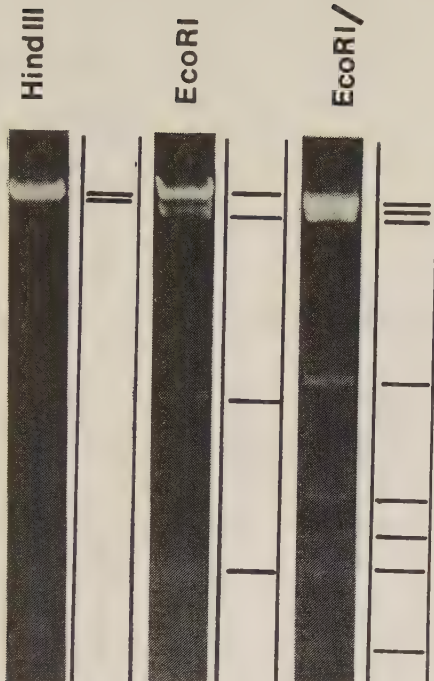


Abb. 31a: HindIII, EcoRI
und EcoRI/Sal
Spaltung von
RP4::ISR3
Elektrophoresebed..
0,8% Agarose, 15V,
12h;

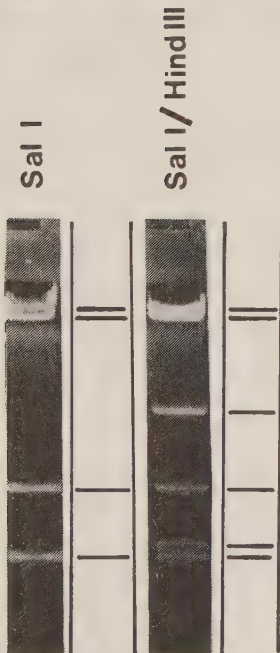


Abb. 31b: SalI und SalI/HindIII Spal-
tung von RP4::ISR3
Elektrophoresebed.: 1,2%
Agarose, 15V, 12h;

<u>HindIII</u>	<u>EcoRI</u>	<u>SalI</u>	<u>MluI</u>	H/S	B/S	E/B
48,4	55,76	22,6	45,5	20,8	22,58	48,9
16,5	5,5	20,8	18,99	19,4	19,4	7,1
	2,3	19,4		16,5	12,6	2,3
	0,94	1,95		4,73	7,9	0,94
				2,1	1,95	
				1,95		

Tab. 15a: Länge der Restriktionsfragmente von RP4::ISR2 in kb

<u>HindIII</u>	<u>EcoRI</u>	<u>SalI</u>	<u>MluI</u>	H/S	B/S	E/S
32,9	47,4	38,5	43,77	33,78	31,08	24,4
33,9	14,0	21,8	21,7	19,4	19,4	19,4
	2,75	2,8		4,73	9,8	14,0
	1,1	2,07		2,8	2,8	2,8
				2,17	2,17	1,5
				2,07		1,2
						1,1
						1,0

Tab. 15b: Länge der Restriktionsfragmente von RP4::ISR3 in kb

<u>HindIII</u>	<u>EcoRI</u>	<u>SalI</u>	<u>MluI</u>	H/S	B/S	E/S
57,95	57,95	38,5	57,95	33,78	31,08	24,42
		19,4		19,4	19,4	19,4
				4,73	7,05	13,8

Tab. 15c: Länge der Restriktionsfragmente von RP4

Abb. 32 und 33 zeigen die Restriktionskarten für ISR2 und ISR3, die sich aus den Doppelspaltungen ergaben.

ISR2

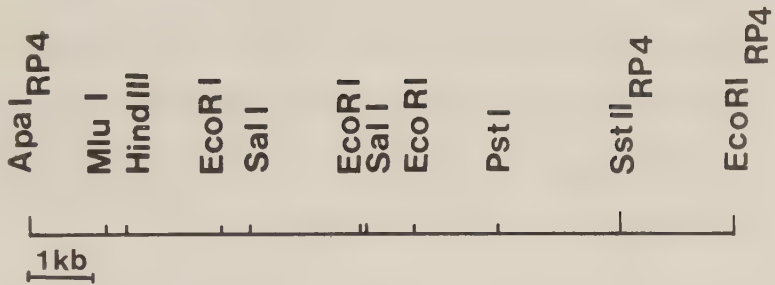


Abb. 32: Restriktionskarte von ISR2

ISR3

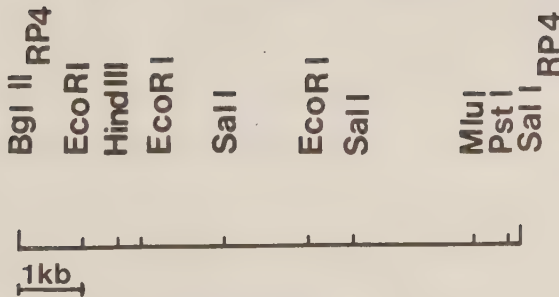


Abb. 33: Restriktionskarte von ISR3

5.4. Aktivität von ISR2 und ISR3 in E. coli

5.4.1. Stabilität der Resistenzmuster von RP4::ISR2 und RP4::ISR3 in E. coli

Im Verlauf der molekularbiologischen Charakterisierung der RP4-Insertionsmutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3 in E.coli wurden wiederholt die Resistenzmuster überprüft. Beide Mutanten zeigten dabei bereits vor der ersten präparativen Plasmidisolierung eine gravierende Veränderung des Resistenzmusters (s. Tab. 16). Solche Variationen des Resistenzmusters wurden bei sehr vielen E. coli Transkonjuganten festgestellt (s. Tab. 6, S. 91)

Stamm	Resistenzmuster direkt nach Rückkreuzung	Resistenzmuster 4 Wochen nach Rückkr.
E. coli SR36 (RP4::ISR2)	A ⁻ K ⁻ N ⁻ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺
E. coli SR24 (RP4::ISR3)	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁺	A ⁺ K ⁺ N ⁺ T ⁻

Tab. 16: Übersicht über die Veränderung der Resistenzmuster der Stämme SR36 (RP4::ISR2) und SR24 (RP4::ISR3).

+ = resistent

- = sensitiv

RP4::ISR2 ist also völlig revertiert, während RP4::ISR3, ursprünglich als negative Kontrolle ausgewählt, jetzt eine Tetracyclinsensitivität zeigt. Beide Plasmide behielten dieses Resistenzmuster während aller weiteren Untersuchungen.

5.4.2. Stabilität von RP4::ISR2 und RP4::ISR3 in

E. coli RecA⁺ und RecA⁻

Dieser Versuch sollte zeigen, ob ISR2 und ISR3 eine RecA unabhängige Transpositionsfunktion in E. coli besitzen. In dieses Experiment wurde die Mutante E. coli CSHR70 (RP4₇₀) mit einbezogen. Das Plasmid RP4₇₀ war ebenfalls in E. coli von A⁺ K⁺ N⁻ T⁺ direkt nach Rückkreuzung zu A⁺ K⁺ N⁺ T⁺ nach einigen Wochen revertiert. Alle Plasmide wurden in den E. coli RecA⁻ Stamm HB101 transferiert. Als negative Kontrolle diente das RP4 Plasmid. Die entsprechenden RecA⁺ Stämme wurden in 10 ml RGMC angeimpft und ohne Antibiotikazugabe über Nacht bei 30°C gerollert. Von diesen Kulturen wurden geeignete Verdünnungsstufen ausgespatelt und die Resistenzmuster überprüft. Jeweils 0,1 ml jeder Kultur wurden dann täglich in frisches Medium überimpft und erneut über Nacht bei 30°C gerollert. Nach 7 Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Da sich die Werte für die einzelnen Tage nicht wesentlich unterscheiden wird in Tabelle 17 nur das Ergebnis des abschließenden Stempeltests nach 7 Tagen zusammengefaßt.

Das Plasmid RP4₇₀ zeigte nur in E. coli RecA⁺ ab dem ersten Tag ein schwächer werden der Neomycinresistenz. D.h. die Kolonien waren nach dem ersten Tag sehr klein, nach der zweiten Passage waren keine neomycinresistenten Kolonien gewachsen, nach der dritten Passage waren 70% der gestempelten Kolonien ganz schwach und 30% nicht auf Neomycin gewachsen,

Plasmid	E. coli Stamm	resistente Kolonien in %				Plasmidverlust
		A	K	N	T	
RP4	RecA ⁺	100	100	100	100	0
RP4::ISR2	RecA ⁺	100	100	100	100	0
RP4::ISR3	RecA ⁺	100	100	100	0	0
RP4 ₇₀	RecA ⁺	100	100	0	100	0
RP4	RecA ⁻	100	100	100	100	0
RP4::ISR2	RecA ⁻	100	100	100	100	0
RP4::ISR3	RecA ⁻	100	100	100	0	0
RP4 ₇₀	RecA ⁻	100	100	100	100	0

Tab. 17: Verhalten der RP4 Insertionsmutanten in E. coli RecA⁺ und RecA⁻.

und ab dem vierten Tag konnten keine neomycinresistenten Kolonien mehr isoliert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Instabilität der RP4 Mutanten nach der Rückkreuzung in E. coli vom wirtsspezifischen Rekombinationssystem abhängt. RP4::ISR2 und RP4::ISR3 zeigten dagegen in diesem Versuch keine erneute Veränderung des Resistenzmusters. Wahrscheinlich ist bei diesen RP4 Mutanten eine Stabilisierung eingetreten. Der zuletzt eingenommene Insertionsort scheint für das jeweilige IS-Element der günstigste zu sein.

6. Analyse der Hybridisierungseigenschaften von ISR2 und ISR3

Die Hybridisierungsversuche sollten Aufschluß über die Verbreitung der beiden Insertionselemente in den verschiedenen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae und die Kopienzahl in den Ausgangsstämmen geben. Außerdem sollte untersucht werden, ob zwischen ISR2 und ISR3 Homologien bestehen. Die erhaltenen Restriktionsmuster sprechen für eine starke Homologie der beiden Elemente.

6.1. Hybridisierung mit verschiedenen Klasse III Stämmen und Bestimmung der Kopienzahl

Für diese Versuche wurden jeweils Gesamt- und Plasmid DNA von 30-19, 30-25 und 30-36 mit BglII gespalten, im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und gegen 32 P-markierte RP4::ISR2 bzw. RP4::ISR3 DNA hybridisiert. Das Enzym BglII wurde gewählt, da beide IS-Elemente keine BglII Erkennungsstelle besitzen. Die negative Kontrollhybridisierung dieser Stämme mit 32 P-markierter RP4 DNA zeigte keine Homologie der 30- Stämme zum RP4 Plasmid. Abb. 34 zeigt das Hybridisierungsergebnis mit RP4::ISR2 und RP4::ISR3. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Tab. 18 zusammengefaßt.

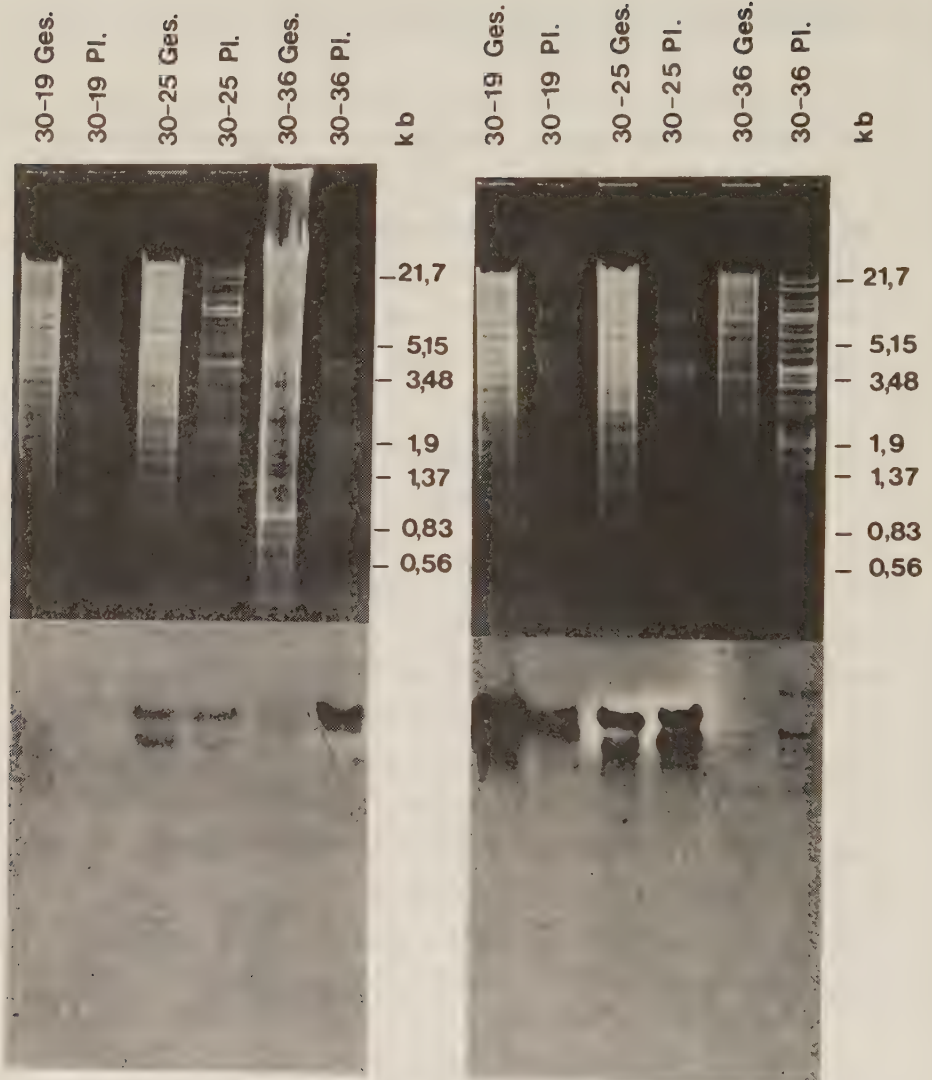


Abb. 34: Hybridisierung von BglIII gespaltener Gesamt- bzw.

Plasmid DNA verschiedener Klasse III Stämme mit
RP4::ISR2 (links) und RP4::ISR3 (rechts).

Elektrophoresebedingungen: 1% Agarose, 25mA. 12h

Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 5 x SSC, 40°C

Als Längenstandard wurde Lambda DNA, gespalten mit

EcoRI und HindIII verwendet.

Radioaktive Probe	30-19		30-25		30-36	
	Ges. DNA	Plas. DNA	Ges. DNA	Plas. DNA	Ges. DNA	Plas. DNA
RP4::ISR2	4	0	4	2	1	2
RP4::ISR3	3	2	2	5	3	5

Tab. 18: Anzahl der Hybridisierungsbanden von ISR2 bzw. ISR3 in Gesamt- und Plasmid DNA verschiedener Klasse III Stämme.

Jeweils die obersten zwei Hybridisierungsbanden mit 30-25 (Herkunftsstamm) Gesamt- und Plasmid DNA sind bei ISR2 und ISR3 identisch. Außerdem hybridisiert ISR3 in den gleichen Banden mit 30-36 Gesamt- und Plasmid DNA wie ISR2. Dies spricht für eine große Homologie zwischen den beiden IS-Elementen. Es ist weniger wahrscheinlich, daß beide IS-Elemente in allen Fällen im selben Restriktionsfragment vorkommen. Eine eindeutige Aussage über die Kopienzahl von ISR2 und ISR3 ist auf Grund der Kreuzhomologie nicht möglich.

6.2. Untersuchung der Homologie zwischen ISR2 und ISR3

Die Restriktionsanalyse und die Hybridisierungsmuster von ISR2 und ISR3 mit verschiedenen Klasse III Stämmen legen die Vermutung nahe, daß beide IS-Elemente sehr starke Homologien aufweisen. Jeweils die beiden obersten Hybridisierungsbanden der beiden IS-Elemente mit dem Herkunftsstamm 30-25 sind in ihrer Größe identisch. Das Restriktionsmuster beider Elemente zeigt auffallende Ähnlichkeiten. Beide haben am rechten Ende eine PstI und am linken Ende eine HindIII Schnittstelle. Sie besitzen zwei Erkennungsstellen für SalI und drei für EcoRI.

Die MluI Erkennungsstelle befindet sich jeweils am entgegengesetzten Ende. Die Anordnung der EcoRI Fragmente ist in ISR2 invers zu der in ISR3. Dies spricht für eine große Homologie der beiden IS-Elemente, aber auch für ein internes Rearrangement. Es kann keine vollständige Identität bestehen, da ISR3 deutlich länger ist als ISR2, und die Polarität der Schnittstellen verschieden ist.

Für den folgenden Versuch wurde RP4::ISR2 DNA mit verschiedenen Enzymen gespalten, die IS-interne Fragmente freisetzen, im Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter geblottet und gegen ^{32}P -markierte RP4::ISR3 DNA hybridisiert. Die Hybridisierung wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt, zuerst aber nur relaxierend gewaschen und exponiert. Da diese Exposition eine Hybridisierung in allen Banden zeigte, wurde stringent nachgewaschen und erneut exponiert. Das Ergebnis ist in Abb. 35 dargestellt. Auch nach stringentem Waschen zeigen beide IS-Elemente eine große Homologie. Der einzige Bereich, der schwächer hybridisiert, ist das EcoRI 0,94 kb Fragment. Diese Bande hybridisiert deutlich schwächer als die übrigen Fragmente.

6.3. Hybridisierung mit den Schemastämmen

6.3.1. Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

Gesamt-DNA der Stämme aller 5 Klassen des *R. meliloti* Schemas wurde mit BglII verdaut und unter stringenten Bedingungen gegen ^{32}P -markierte RP4, RP4::ISR2- und RP4::ISR3 DNA hybridisiert. Außer den bereits gezeigten Hybridisierungsbanden mit dem Ausgangsstamm 30-25 war keine Hybridisierung nachzu-

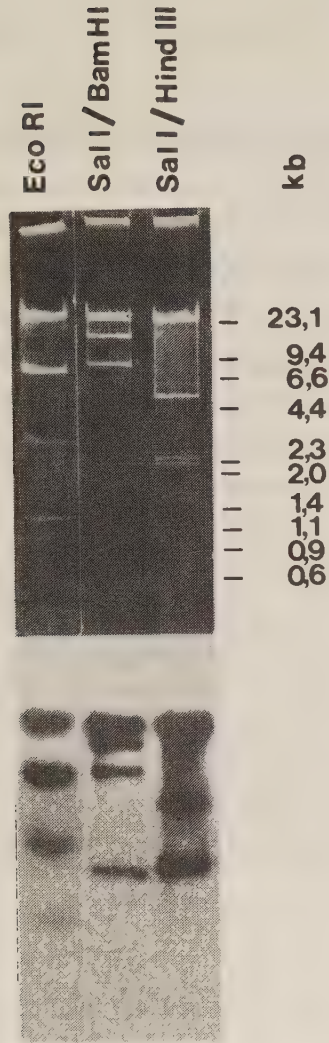


Abb. 35: Hybridisierung von EcoRI, SalI/BamHI und SalI/HindIII verdauter RP4::ISR2 DNA mit 32 P-markierter RP4::ISR3 DNA.

Elektrophoresebedingungen: 0,8% Agarose; 12h; 25 mA;
Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 5 x SSC, 46°C
Als Längenstandard wurde HindIII verdaute Lambda DNA
sowie HaeIII verdaute PhiX 174 DNA verwendet.

weisen. Weiter fand keine Hybridisierung mit Gesamt-DNA aus *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *X. badrii* statt.

6.3.2. Hybridisierung unter relaxierenden Bedingungen

Gesamt-DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas wurden wieder mit BglII verdaut, und diesmal unter relaxierenden Bedingungen gegen RP4::ISR2 und RP4::ISR3 hybridisiert. Als negative Kontrolle diente wieder Gesamt-DNA aus *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *X. badrii*. Außerdem wurden jeweils identische Gele wieder mit RP4 hybridisiert. Mit RP4::ISR2 wurde auch unter diesen Bedingungen keine Hybridisierung mit Stämmen anderer Klassen gefunden. Bei RP4::ISR3 wurden zwar Hybridisierungsbanden mit Wildtyp Stämmen gefunden, dieselben Banden traten jedoch vereinzelt auch in den negativen Kontrollen mit ³²P-markierte RP4 DNA auf. Es kann daher also nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, daß zwischen ISR3 und Wildtypstämmen Homologien bestehen. Hierfür müßten geeignete Fragmente von ISR3 kloniert werden, und nochmals gegen die Gesamt-DNA der Stämme des *R. meliloti* Schemas hybridisiert werden.

E. Diskussion

Heumann konnte zeigen, daß die Rhizobiaceae zur Genomumstrukturierung befähigt sind. DNA-Schädigung durch UV-Licht oder Mutagene und anschließende Stressbehandlung bewirken ein vollständiges Rearrangement. Es entstehen fünf verschiedene Klassen, mit spezifischen morphologischen und molekularbiologischen Eigenschaften, so daß man sie auch als Species bezeichnen kann. Die Umstrukturierung ist im allgemeinen reversibel. Setzt man einen Stamm einer Klasse erneut Stressbedingungen aus, erhält man durch Rearrangement Vertreter anderer Klassen.

Die vorliegende Arbeit sollte erste Ansatzpunkte zur Aufklärung des Mechanismus der Genomumstrukturierung liefern. Es wurde angenommen, daß Insertionselemente dabei eine wesentliche Funktion übernehmen, da bekannt ist, daß IS-Elemente unter Stressbedingungen verstärkt translocieren. S. Iida et al., (1983) beschreiben die vielfältigen Funktionen der IS-Elemente und ihre Rolle bei Genomumstrukturierungen. Daher wurde zunächst Vorkommen und Verbreitung der bisher aus Rhicobiaceae bekannten IS-Elemente, ISR1 und ISRM1, untersucht.

1. Hybridisierung der Schemastämme mit dem Insertionselement ISR1

1.1. Hybridisierung verschiedener Klasse IV Stämme mit ISR1

Stämme der Klasse IV, der Herkunftsklasse des Insertionselements ISR1, lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Erstens, die stäbchenförmigen, mit 1- bezeichneten Stämme und zweitens, die als Bacterioide wachsende 33- Gruppe. Beide Gruppen

sind durch gelb- bis orangefarbige Carotinoide pigmentiert. Alle Klasse IV Stämme, bis auf zwei Ausnahmen, haben unabhängig von ihrer Herkunft, soweit bei Auftrennung von Restriktionsfragmenten von Gesamt DNA beurteilbar, das gleiche Restriktionsmuster. Dies gilt für alle bisher angewendeten Restriktionsenzyme (Bam HI, BglII, HindIII, SalI, SmaI, XbaI, XhoI; alle Klasse IV Stämme sind nicht mit EcoRI spaltbar.) Die einzige Ausnahme hierin von allen bisher untersuchten Klasse IV Stämmen sind 1-928 (Herkunft:R. japonicum 31Ib1) und 1-929 (Herkunft: R. meliloti 20-43). Diese beiden Stämme zeigen ein für sich identisches, aber von allen anderen Klasse IV Stämmen verschiedenes Restriktionsmuster.

Trotz des gleichen Restriktionsmusters gibt es kaum zwei Klasse IV Stämme, die ein identisches Hybridisierungsmuster mit ISR1 aufweisen, obwohl manche Stämme gemeinsame Banden haben. Dies gilt auch für Stämme, die denselben Ursprungsstamm haben. Die meisten untersuchten Stämme besitzen sechs oder mehr Kopien von ISR1. Auch hier fallen wieder die beiden bereits genannten Stämme 1-928 und 1-929 auf, die höchstens zwei Kopien zeigen. Diese beiden Kopien sind wieder in verschiedenen Restriktionsfragmenten lokalisiert, obwohl beide Stämme, soweit erkennbar, ein identisches Restriktionsmuster besitzen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß ein, soweit aus dem Gelbild zu ersehen, identisches Restriktionsmuster bei Auftrennung von Gesamt DNA im Agarosegel, nicht unbedingt auf eine absolute Identität der Genome schließen läßt.

1.2. Hybridisierung repräsentativer Stämme aller Klassen mit ISR1

Diese Versuche zeigen, daß auch unter relaxierenden Bedingungen weder in den Stämmen der übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae, noch in den negativen Kontrollstämmen, homologe Sequenzen zu ISR1 vorhanden sind. ISR1 ist also ein ganz spezifisches Element der Klasse IV Stämme, das spontan bei der Umstrukturierung zur Klasse IV reversibel entsteht. Da die einzelnen Klassen sehr unterschiedliche phänotypische Merkmale aufweisen, und auch durch ein eigenes Restriktions- und Modifikationssystem gegeneinander abgegrenzt sind, ist es nicht ungewöhnlich, daß auch klassenspezifische IS-Elemente existieren.

1.3. Stabilität von ISR1 im Klasse IV Genom unter Stressbedingungen

In diesem Versuch sollte das Translocationsverhalten von ISR1 unter Stressbedingungen untersucht werden. Nach sechswöchigem Stress wurden Kolonien isoliert, die phänotypisch dem Ausgangsstamm glichen. Es wurde angenommen, daß solche Stämme ein verändertes Hybridisierungsmuster zu ISR1 zeigen. Da bei Umwandlung in andere Klassen ISR1 nicht mehr nachweisbar ist, können nur Stämme, die nach gelindem Stress eine Aktivierung von IS-Elementen ohne Umstrukturierung erhielten, Aufschluß über das Transpositionsverhalten von ISR1 im Klasse IV Genom geben.

Die Hybridisierung der XhoI verdauten Gesamt-DNA der isolierten Stämme zeigte jedoch nur sehr geringe Unterschiede zum Ausgangsstamm. Es fällt auf, daß die meisten Unterschiede auf

Reduktion von ISR1 zurückzuführen sind. Es konnte keine neue Kopie von ISR1 nachgewiesen werden. Eine mögliche Interpretation hierfür wäre, daß die Reduktion von ISR1 aus dem Klasse IV Genom ein sehr frühes Ereignis in der Genomumstrukturierung ist. Die teilweise oder vollständige Reduktion von ISR1 geht wahrscheinlich bereits mit phänotypischen Veränderungen einher, so daß solche Stämme in diese Versuche nicht einbezogen wurden. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß nur die invertierten Enden von ISR1 nach der Umstrukturierung erhalten bleiben, bzw. an der Umstrukturierung beteiligt sind. Diese Sequenzen könnten für einen Nachweis unter den gegebenen Bedingungen zu kurz sein. Die bisherigen Ergebnisse lassen somit keine eindeutige Aussage über die Bedeutung von ISR1 bei der Genomumstrukturierung zu.

2. Hybridisierung der Schemastämme mit dem Insertionselement ISRM1

Das Insertionselement ISRM1 (Ruvkun et al., 1982) ist neben ISR1 das einzige, näher charakterisierte Insertionselement aus Rhizobiaceae. Kondorosi berichtet von einem weiteren IS-Element aus einem *R. meliloti* Stamm, ISRM2 (Konorosi et al., 1983), das aber noch nicht eingehend untersucht worden ist.

ISRM1 ist spezifisch für den Stamm *R. meliloti* 1021. Es konnte bisher weder in anderen *R. meliloti* Stämmen, noch in anderen Wirtsklassen nachgewiesen werden.

Die Hybridisierungen der Schemastämme mit ISRM1 wurden durchgeführt, um ein komplettes Bild des Hybridisierungsverhaltens der beiden bisher bekannten Insertionselemente der Rhizobiaceae zu erhalten. Die von ISRM1 bekannten Daten ließen bereits darauf schließen, daß ihm bei der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae keine umfassende Rolle zukommen kann.

3. Suche nach neuen IS-Elementen in Rhizobiaceae

Es wurde angenommen, daß IS-Elemente, die eine wesentliche Funktion bei der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae haben, in allen Klassen nachweisbar sein sollten. Daher wurde versucht, weitere IS-Elemente zu isolieren, und zu prüfen, ob sie diese Forderungen erfüllen.

3.1. Isolierung weiterer IS-Elemente aus Rhizobiaceae durch Stress

Für die Suche nach weiteren IS-Elementen in Rhizobiaceae wurde ein genetisches System gewählt. Das "Fischen" nach IS-Elementen mit RP4 als Akzeptormolekül ist zwar langwierig, bietet aber den Vorteil, daß die so erhaltenen Insertionen mit großer Sicherheit translocierbare Elemente sind, da sie in vivo von einem anderen Replicon auf das RP4 Plasmid translociert sind. Eine Möglichkeit zur in vitro Isolierung von IS-Elementen wurde von Ohtsubo (Ohtsubo et al., 1981), beschrieben. Hier wurde Gesamt-DNA denaturiert, kurz renaturiert und einzelsträngige DNA mit S1 Nuclease abgebaut. Übrig bleiben u. a. renaturierte invertierte Sequenzen, die im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Jede erhaltene Bande könnte also von einem IS-Element herrühren. Für jedes der so isolierten IS-Elemente muß nun aber in vivo gezeigt werden, daß es sich wirklich um ein IS-Element handelt. Solche Versuche sind in *E. coli* relativ leicht durchzuführen, da man hier über entsprechende Kenntnisse über das Transpositionsverhalten von *E. coli* IS-Elementen und geeignete Stämme verfügt. Da über IS-Elemente in Rhizobiaceae vergleichsweise wenig bekannt ist, schien die gewählte Methode die günstigere zu sein.

3.2. Notwendigkeit von Stressbedingungen zur Anregung der Translocation von IS-Elementen in Rhizobiaceae

Während ISR1 unter den in D.3.3. (S. 81) beschriebenen Bedingungen im Prozentbereich translociert, konnten in den übrigen Klassen des Schemas der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae unter diesen Bedingungen keine IS-Elemente nachgewiesen werden. Erst wenn die Stämme über einen längeren Zeitraum in der Stationärphase gehalten wurden (Stress), konnten Insertionen im RP4 Plasmid gefunden werden. Das Wachstumsmedium spielte dabei eine untergeordnete Rolle. Unter den beschriebenen Stressbedingungen konnten aus allen Klassen veränderte RP4 Plasmide im Prozentbereich reisoliert werden. Dieses Verhalten ist auch charakteristisch für E. coli IS-Elemente (H. J. Reif, 1981; S. Iida et al., 1983). Unter den angewendeten Stressbedingungen konnte keine Umstrukturierung beobachtet werden. Sie entsprechen damit den in D.3.4. (S. 84) gesetzten Anforderungen.

Die Genome der einzelnen Klassen sind in sich sehr einheitlich und stabil. Für die Induktion der Umstrukturierung sind sehr massive DNA-Schädigungen und Stressbedingungen nötig. Neue Arbeiten von Heumann (Heumann, 1984) zeigen, daß die Umstrukturierung nach UV-Behandlung und anschließendem Rollern in Stressmedium deutlich gesteigert und beschleunigt wird. Heumann geht davon aus, daß UV-stimulierte Funktionen, die dem SOS-System von E. coli (E. M. Witkin, 1976; J. W. Little und D. W. Mount, 1982) ähnlich sind, die Transposition von IS-Elementen und damit die Umstrukturierung entscheidend beeinflussen. Die neuesten Ergebnisse seiner Arbeitsgruppe weisen deutlich in diese Richtung.

4. Charakterisierung der Insertionsmutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3

4.1. Unterschiede im phänotypischen Resistenzmuster der RP4 Mutanten in Rhizobiaceae und in E. coli

Es fällt auf, daß bei RP4 tragenden Wildtypstämmen der Klasse I und II, die nicht aus einem Stressversuch isoliert wurden, wie *R. meliloti* 2011, E9, E10, MVII/1, *R. leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli* und *A. tumefaciens* B6 fast ausschließlich ampicillinsensitive Kolonien erhalten wurden, während Stämme, die nach Umstrukturierung isoliert wurden, ein breiteres Spektrum an Resistenzverlust aufwiesen. Dies spricht dafür, daß Genome von Stämmen, die aus einem Umstrukturierungsversuch hervorgegangen sind, variabler sind, als die vergleichbarer Stämme, die nicht durch Umstrukturierung gewonnen wurden. Diese Variabilität könnte durch eine Erhöhung der Anzahl an IS-Elementen während der Umstrukturierung entstehen. Findet nach der Umstrukturierung keine Reduktion der IS-Elemente statt, könnten diese IS-Elemente bei einem erneuten Stressversuch auch verstärkt in das Akzeptormolekül RP4 translocieren. So ist z. B. auch der Prozentsatz, der erhaltenen RP4-Mutanten aus *A. tumefaciens* B6 deutlich niedriger, als aus den nach Umstrukturierung isolierten Stämmen 18-23, 18-30 und 18-31 (s. Tab. 5, S. 88).

Völlig unerwartet war das Ergebnis der Rückkreuzungen der erhaltenen RP4 Mutanten nach *E. coli*. Die meisten Transkonjuganten zeigten ein anderes Resistenzmuster als die *Rhizobium* Donoren. Von fast allen ampicillinsensitiven *Rhizobium* Donoren wurden ampicillinresistente Transkonjuganten erhalten.

Auch die Anzahl der Revertanten, d. h. Transkonjuganten, die wieder alle RP4 spezifischen Resistenzen exprimierten, war unerwartet hoch. Die durchschnittliche Reversionsrate betrug 41.9%. Wie bereits erwähnt, beruht die Ampicillinsensitivität in den meisten Fällen auf Expressionsschwierigkeiten, und nicht auf der Insertion eines IS-Elements. Die hohe Reversionsrate der Ampicillinresistenz ist daher nicht so ungewöhnlich. Für die Resistenzunterschiede von *Rhizobium* Donoren zu *E. coli* Transkonjuganten in den übrigen Resistenzdeterminanten gibt es nur wenig Erklärungsmöglichkeiten. So kann z. B. eine Insertion in Resistenzgene für Antibiotika, gegen die die *Rhizobien* eine natürliche Resistenz aufweisen, in *Rhizobium* nicht festgestellt werden, da in diesen Fällen der Ausfall einer RP4 bedingten Resistenz durch die entsprechende, natürliche Resistenz der *Rhizobiaceae* komplementiert wird.

Die hohe Reversionsrate könnte auch durch Instabilität der rhizobienspezifischen IS-Elemente im artfremden genetischen System *E. coli* erklärt werden. Dies würde allerdings eine hohe Effizienz der korrekten Excision dieser IS-Elemente voraussetzen, da das ursprünglich betroffene Resistenzgen wieder voll funktionsfähig wird.

In *Rhizobien* werden wahrscheinlich nicht alle Regionen des RP4 Plasmids exprimiert. Die Insertion in eine nicht- oder nur schwach exprimierte Region ist sicher stabiler als die in eine stark exprimierte Region. Durch den Rücktransfer nach *E. coli* werden diese Regionen wieder aktiviert. Dabei könnte die Insertion eines IS-Elements wichtige Funktionen blockieren, so daß bevorzugt Zellen wachsen, die das Insertionselement wieder verloren haben.

In sehr vielen Fällen zeigen die *E. coli* Transkonjuganten die Wiederherstellung einer in *Rhizobium* nicht mehr funktionsfähigen Antibiotikaresistenz, dafür aber den Verlust einer anderen, die in *Rhizobium* noch exprimiert war. Eine Komplementation einer ausgefallenen RP4 Resistenz durch die natürliche Resistenz des betreffenden *Rhizobium*stammes, kann diese Beobachtung in den meisten Fällen nicht erklären. Außerdem ist das Resistenzbild auch in *E. coli* in den meisten Fällen nicht stabil. Selbst Plasmide, die in *E. coli* noch alle RP4 spezifischen Resistenzen aufwiesen, und als negative Kontrolle verwendet wurden, zeigten nach einiger Zeit ebenfalls den Ausfall einer Antibiotikaresistenz. Das war z. B. bei der Mutante RP4::ISR3 der Fall. Das würde bedeuten, daß ein echter Positionswechsel des Insertionselements im RP4 Plasmid, ohne Zurücklassung einer Kopie am Ausgangsort stattgefunden hat. Bisher gültige Theorien zur Translocation prokaryonten mobiler genetischer Elemente fordern jedoch, daß bei Transposition eine Kopie am Ausgangsort zurückbleibt (J. A. Shapiro, 1979, S. Iida et al., 1983).

Saedler (1983) berichtet über Hinweise, daß diese Theorie nicht uneingeschränkt gültig ist. Ein Wechsel der Insertionsorts, ohne Zurücklassung einer Kopie am ersten Insertionsort, würde das Verhalten der *E. coli* Transkonjuganten am ehesten erklären. In den Mutanten RP4::ISR2 und RP4::ISR3 hat eine Veränderung des Resistenzmusters stattgefunden, ohne daß eine Kopie am Ausgangsort zurückgeblieben ist. Die ursprünglich betroffenen Resistenzgene waren bei RP4::ISR2 wieder funktionsfähig. In keinem der Hetero- oder Homoduplexversuche konnten Moleküle gefunden werden, die zwei Insertionselemente enthielten. Der neu eingenommene Insertionsort wurde stabil beibehalten.

Auch ohne Selektionsdruck wurden in diesen Mutanten keine erneuten Resistenzveränderungen festgestellt.

In dem Fall der RP4 Mutante RP4₇₀ könnte auch ein Inversionsmechanismus, ähnlich der Phasenvariation bei Salmonella (M. Simon et al., 1980) eine Rolle spielen. Der Stamm CSHR70 (RP4₇₀) war direkt nach Rückkreuzung neomycin-sensitiv und revertierte einige Wochen danach zur Neomycin-resistenz. Während des unter 5.4.2. (S. 125) beschriebenen Versuchs wurde er erneut neomycinsensitiv.

Diese Ergebnisse legen einen Vergleich mit eukaryonten mobilen genetischen Elementen nahe. So kann z. B. bei Mais durch "Schock" eine Destabilisierung des Genoms ausgelöst werden. Bisher inaktive genetische Elemente werden aktiviert und bleiben aktiv, bis eine neue, stabile Konfiguration des Genoms erreicht ist (J. A. Shapiro und B. Cordell, 1982). Vergleichbar mit dem "Schock" bei Eucaryonten wäre in Prokaryonten die zygotische Induktion von Bacteriophagen oder die Induktion des SOS-Repair Systems. Mobile genetische Elemente der Eucaryonten können translocieren, ohne eine Kopie am Ausgangsort zurückzulassen.

Für die Aufklärung dieser Beobachtungen zum Translocationsverhalten von IS-Elementen aus Rhizobiaceae wäre es von großem Interesse, die Analyse der RP4 Mutanten aus Rhizobien in E. coli auf einer breiteren Basis durchzuführen.

4.2. ISR2 und ISR3 - zwei neue Insertionselemente aus Rhizobien?

ISR2 und ISR3 erfüllen drei wesentliche Punkte, die für die Identifizierung neuer IS-Elemente gefordert werden (S. Iida et al, 1983).

1. Sie zeigen Translocationsaktivitäten in Rhizobium. Sie können vom Rhizobiengenom auf das Akzeptormolekül RP4 transponieren.
2. Sie zeigen im Elektronenmikroskop eine charakteristische Transposonstruktur.
3. Diese Transposonstruktur zeigt invers repetitive Sequenzen an den Enden der beiden IS-Elemente.

Die einzigen bisher beschriebenen IS-Elemente aus Rhizobien sind ISR1 und ISRM1. ISR2 und ISR3 sind nicht mit diesen Elementen verwandt, was aus den Hybridisierungsanalysen mit ISR1 und ISRM1 hervorgeht. Sie sind außerdem wesentlich größer als diese beiden IS-Elemente. ISR2 und ISR3 können daher als neue IS-Elemente aus Rhizobiaceae bezeichnet werden.

4.2.1. IS-Elemente oder Transposonen?

ISR2 und ISR3 sind mit 6,55 kb bzw. 7,29 kb sehr groß. Das größte bisher bekannte IS-Element γ' ist 5,7 kb lang (M. S. Guyer, 1978). "Klassische" IS-Elemente sind etwa 1-2 kb groß. ISR2 und ISR3 könnten auf Grund ihrer Größe und der für beide im Elektronenmikroskop nachgewiesenen Struktur auch Transposonen sein. Da für beide aber bisher keine phänotypische Funktion nachgewiesen werden konnte, muß man zunächst bei der Bezeichnung IS-Element bleiben. Sie müssen aber in jedem Fall der Klasse der komplexeren IS-Elemente (S. Iida et al., 1983) zugeordnet werden. Ein Punkt, der eher für Transposonen spricht, ist, daß bei der Hybridisierung von RP4::ISR2 mit dem Herkunftstamm 30-25 kleinere Hybridisierungsbanden auftreten, als der Größe von ISR2 entsprechen. Das ist ungewöhnlich, da die Gesamt-DNA von 30-25 mit BglII

verdaut wurde, und ISR2 mit Sicherheit nicht durch BglII geschnitten wird. Man hätte daher nur Hybridisierungsbanden erwartet, die größer als oder gleichgroß wie ISR2 sind. Dies könnte dafür sprechen, daß ISR2 doch ein Transposon ist, das von IS-Elementen flankiert wird. Die flankierenden IS-Elemente könnten auch außerhalb des Transposons im Genom vorkommen, und zu kleineren Hybridisierungsbanden führen.

4.3. Homologie von ISR2 und ISR3

ISR2 und ISR3 weisen einen hohen Homologiegrad auf. ISR3 hybridisiert mit ISR2 in allen Fragmenten. Nur das EcoRI 0,94 kb Fragment von ISR2 hybridisiert etwas schwächer mit ISR3 als die übrigen Fragmente von ISR2. Auch die Zahl und Anordnung der Restriktionsfragmente ist bei beiden IS-Elementen sehr ähnlich. Dies spricht dafür, daß die beiden IS-Elemente sehr nah verwandt, wenn nicht sogar teilweise identisch sind. ISR3 unterscheidet sich von ISR2 durch eine zusätzliche DNA Sequenz von 0, 74 kb.

Auffallend ist die hohe Instabilität von RP4::ISR2 in *E. coli* und die dadurch bedingten heterogenen Plasmid-isolierungen von RP4::ISR2 zu Beginn der Charakterisierung von ISR2. Bei RP4::ISR3 konnte niemals eine derartige Instabilität beobachtet werden. Möglicherweise bewirkt das zusätzliche 0,74 kb DNA Segment in ISR3 diese Stabilität, bzw. ihr Fehlen in ISR2 die Instabilität von ISR2.

Auch hier bietet sich wieder ein Vergleich mit mobilen genetischen Elementen aus Eukaryonten an. Sie zeigen eine interne Variabilität (J. A. Shapiro und B. Cordell, 1982). So haben z. B. Ty Elemente aus *Saccharomyces cerevisiae* unterschiedliche

interne Strukturen (G. S. Roeder et al., 1980).

4.4. IS-Elemente und Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae

Die vorliegende Arbeit bietet erste Anhaltspunkte zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Genomumstrukturierung der Rhizobiaceae. Es konnte gezeigt werden, daß durch Stressbedingungen IS-Elemente in Rhizobien aktiviert werden. Die neuesten Ergebnisse von Heumann (Heumann, 1984) sprechen dafür, daß Enzymfunktionen ähnlich dem SOS Repair von *E. coli*, die Umstrukturierung induzieren. Heumann konnte die Umstrukturierung durch UV-Bestrahlung oder chemische Mutagenese vor der Stressbehandlung deutlich beschleunigen. Dies spricht dafür, daß DNA Schäden und Stressbedingungen zur Induktion der Genomumstrukturierung nötig sind. Die Versuche zur Isolierung neuer Insertionselemente aus Rhizobiaceae deuten ebenfalls in diese Richtung. Unter normalen Wachsbbedingungen konnte keine Transposition von IS-Elementen in das RP4-Plasmid nachgewiesen werden. Aber die hohe Frequenz, mit der phänotypische Resistenzmutanten des RP4 Moleküls nach Stressbehandlung isoliert werden konnten, zeigt deutlich, daß Insertionselemente bei der Umstrukturierung eine wesentliche Rolle spielen. Besonders interessant sind die Ähnlichkeiten zu mobilen genetischen Elementen der Eukaryonten. Eine genaue Analyse des Translocationsverhaltens der IS-Elemente aus Rhizobiaceae ist daher für die Aufklärung des Mechanismus der Genomumstrukturierung von großer Bedeutung.

In weiteren Arbeiten muß nun das Verhalten von ISR2 und ISR3 in den Klasse III Stämmen genau analysiert werden. Weiter

sollten aus den übrigen Klassen IS-Elemente isoliert werden, um die Frage zu klären, ob jede Klasse spezifische IS-Elemente besitzt, oder ob Sequenzen vorhanden sind, die in allen Klassen nachweisbar sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob bei der Umstrukturierung auch größere DNA Segmente die Position wechseln, wie es in einer Arbeit über *R. japonicum* (J. O. Berry und A. G. Atherly, 1984) beschrieben ist.

Anhang 1: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ap oder A:	Ampicillin
AS:	Aminosäure(n)
B:	Restriktionsendonuclease <u>Bam</u> HI
ccc-DNA:	kovalent geschlossener DNA-Ring
E:	Restriktionsendonuclease <u>Eco</u> RI
H:	Restriktionsendonuclease <u>Hind</u> III
ilv:	Isoleucin-Valin
kb:	Kilobase
Km oder K:	Kanamycin
MM:	Minimalmedium
MM+D:	Minimalmedium + Dextrin
NB:	Nutrient Broth
Nm oder N:	Neomycin
Nx:	Nalidixinsäure
oc-DNA:	offener DNA-Ring
OD:	optische Dichte
o.n.	über Nacht
P:	Restriktionsendonuclease <u>Pst</u> I
prt:	prototroph
r:	resistent
S:	Restriktionsendonuclease <u>Sma</u> I
s:	sensitiv
Sm:	Streptomycin
Tc oder T:	Tetracyclin
X:	Restriktionsendonuclease <u>Xho</u> I
YMB:	Yeast Mannitol Broth

Anhang 2: Literaturverzeichnis

AUSUBEL, F. M. (1982): Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation.

Cell, 29, 1

AUSUBEL, F. M. (1983): Persönliche Mitteilung

BARTH, P. I. und GRINTER, N. J. (1977a): Map of plasmid RP4 derived by insertion of transposon C.

J. Mol. Biol. 113, 455

BARTH, P. I. und GRINTER N. J. (1977b): A Tn7 insertion map of RP4.

in DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, eds. Bukhari, A. I., J. A. Shapiro and S. L. Adhya; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, Seite 675

BARTH, P. I., N. J. GRINTER und D.E. BRADLEY (1978) Con-jugal transfer system of plasmid RP4: Analysis by Transposon 7 insertion.

J. Bact. 133, 43

BARTH, P. I. (1979): RP4 and R300B as wide host-range plasmid cloning vehicles.

in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance; eds. Timmis, K. N. und A. Pühler; Elsevier/North-Holland Biomedical Press; Seite 399

BAUER, I. (1981): Genomumstrukturierung bei Rhizobiaceae. Diplomarbeit, Universität Erlangen

BAUER, W. D. (1981): Infection of legumes by Rhizobiaceae. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 407

BAZARAL, M. und HELINSKI D. R. (1968): Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from Escherichia coli.

J. Mol. Biol. 36, 185

- BERINGER, J. E. (1974): R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol. 84, 188
- BERRY, J. O. und ATHERLY, A. G. (1984): Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*.
J. Bact. 157, 218
- BIRNBOIM, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acid Res. 7, 1513
- BURKARDT, H. J. RIESS, G. und PÜHLER, A. (1979): Relationship of group P1 plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical.
J. Gen. Microbiol. 114, 341
- CALOS, M. P. und MILLER, J. H. (1980): Transposable Elements. Cell 20, 579
- CAMPBELL, A., BERG, D. E., BOTSTEIN, D., LEDERBERG E. M., NOVICK, R. P., STARLINGER, P. und SZYBALSKI, W. (1977): Nomenclature of transposable elements in procaryotes.
in DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes; eds. Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., und Adhya, S. H.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; NY; Seite 15
- CAMPBELL, A. (1981): Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 55
- CHILTON, M. D. (1982): Integration and transcription of Ti plasmid fragments.
in Molecular Biology of Plant Tumors, Academic Press, Seite 299

- DATTA, N., HEDGES, R. W., SHAW, E. J., SYKES, R. B. und RICHMOND, M. H. (1971): Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bact. 108, 1244
- DATTA, N. und HEDGES, R. W. (1972): Hostrange of R factors.
J. Gen. Microbiol. 70, 453
- DAVIS, R. W. und DAVIDSON, N. (1968): Electron-microscopic visualization of deletion mutants.
PNAS, 60, 243
- EARLY, P. und HOOD, L. (1981): Allelic exclusion and non-productive immunoglobulin gene rearrangements.
Cell 24, 1
- ECKHARDT, T. (1978): A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria.
Plasmid 1, 584
- FIGURSKI, D., MEYER, R., MILLER, D. S. und HELINSKI, D. R. (1976): Generation in vitro of deletions in the broad host range plasmid RK2 using phage Mu insertions and a restriction endonuclease.
Gene 1, 107
- GELVIN, S. B., KARCHER, S. J., DI RITA, V. J. und TALIERCIO, E. W. (1983): Transcription of the Ti-plasmid in crown gall tumors.
in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction, ed. A. Pühler; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 292
- GUYER, M. S. (1978): The γ^{δ} sequence of F is an insertion sequence.
J. Mol. Biol. 126, 317

HADLEY, R. G. und SZALAY, A. A. (1982): DNA sequences homologous to the T DNA region of *Agrobacterium tumefaciens* are present in diverse *Rhizobium* species.

Mol. Gen. Genet. 188, 361

HANSEN, J. B. und OLSEN, R. H. (1978): Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5.

J. Bact. 135, 227

HEDGES, R. W. und JACOB, A. E. (1974): Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons.

Mol. Gen. Genet. 132, 31

HEFFRON, F., RUBENS, C. und FALKOW, S. (1975a): Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: Molecular nature and specificity of insertion.

PNAS, 72, 3623

HEFFRON, F., SUBLETT, R., HEDGES, R. W., JACOB, A. und FALKOW, S. (1975b): Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids.

J. Bact. 122, 250

HEUMANN, W. (1968): Conjugation in starforming *Rhizobium lupini*.

Mol. Gen. Genet. 102, 132

HEUMANN, W. (1979): *Rhizobium lupini* genetics.

in Current Topics in Microbiology and Immunology Vol. 88
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 1

HEUMANN, W. (1981): *Rhizobium* genetics.

in Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur; ed. H. Bothe und
A. Trebst; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 87

HEUMANN, W. MERKT, B., RÖSCH, A., SPRINGER, R., RÜGER, B.,
HORN, D., BAUER, I., WINKLER, K. und WAGNER, E. (1983): 'Genome rearrangement of the Rhizobiaceae.

in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction;
ed. A. Pühler; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 373
HEUMANN, W. (1984): Persönliche Mitteilung

HOLMES, D. S. und QUIGLEY, M. (1981): A rapid boiling method
for the preparation of bacterial plasmids.

Anal. Biochem. 114, 193

HOLLOWAY, B. W. und RICHMOND, M. H. (1973): R factors used
for genetic studies in strains of Pseudomonas aeruginosa and
their origin.

Genet. Res. 21, 103

HORN, D. (1981): Persönliche Mitteilung

HORN, D. (1982): Persönliche Mitteilung

HORN, D. (1983): Persönliche Mitteilung

HUGUET, T., ROSENBERG, C., CASSE-DELBART, F., DE LAJUDIE, P.,
JOUANIN, L., BATUT, J., BOISTARD, P., JULLIOT, J. S. und DENARIE,
J. (1983): Studies on Rhizobium meliloti plasmids and on
their role in the control of nodule formation and nitrogen
fixation: The pSym megaplasmids and the other large plasmids.

in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction; ed.
A. Pühler; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 35

IFFT, J. B., VOLT, D. H. und VINOGRAD, J. (1961): The
determination of density distribution and density gradients
in binary solution at equilibrium in the ultracentrifuge.

J. Phys. Chem. 65, 1138

IIDA, S., MEYER, J. und ARBER, W. (1983): Prokaryotic IS
Elements.

in Mobile Genetic Elements; ed. J. A. Shapiro; Academic Press
Seite 159

ISH-HOROWICZ, D. und BURKE, J. F. (1981): Rapid and efficient cosmid cloning.

Nucl. Acid Res. 9, 2989

KAPP, D. (1983): Persönliche Mitteilung

KLEINIG, H., HEUMANN, W., MEISTER, W. und ENGLERT, G. (1977): Carotinoids of Rhizobia. I. New Carotinoids from Rhizobium lupini.

Helvetica Chimica Acta 60, 254

KLEINIG, H., SCHMITT, R., MEISTER, W., ENGLERT, G. und THOMMEN, H. (1979): New C₃₀-Carotenoic acid glucosyl esters from Pseudomonas rhodos.

Z. Naturforsch. 34c, 181

KLEING, H. und SCHMITT, R. (1982): On the biosynthesis of C₃₀-Carotenoic acid glucosyl esters in Pseudomonas rhodos. Analysis of car-mutants.

Z. Naturforsch. 37c, 758

KLEINIG, H. und BROUGHTON, W. J. (1982): Carotinoid pigments in a red strain of Rhizobium from Lotononis bainesii Baker.

Arch. Mikrobiol. 133, 164

KLEINSCHMIDT, A. K. und ZAHN, R. K. (1959): Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Protein Mischfilmen.

Z. Naturforsch. 14b, 770

KONDOROSI, A. (1983): Persönliche Mitteilung

LANKA, E., LURZ, R. und FÜRSTE, J. P. (1983): Molecular cloning and mapping of SphI restriction fragments of plasmid RP4.

Plasmid, 10, 307

LITTLE, J. W. und MOUNT, D. W. (1982): The SOS Regulatory System of E. coli.

Cell 29, 11

LURZ, R. (1983): Persönliche Mitteilung

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. und SAMBOOK, J. (1982): Molecular cloning-a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY

MEYER, J., IIDA, S. und ARBER, W. (1980): Does the insertion element IS1 transpose preferentially into A+T-rich DNA segments? Mol. Gen. Genet. 178, 473

NUTI, M. P., LEPIDI, A. A., PRAKASH, R. K., HOOYKAAS, P. J. J. und SCHILPEROORT, R. A. (1982): The plasmids of Rhizobium and symbiotic nitrogen fixation.

in Molecular Biology of Plant Tumors; Academic Press Inc., S. 561

O'GARA, F. und DUNICAN, L. K. (1973): Transformation and physical properties of R-factor RP4 transferred from Escherichia coli to Rhizobium trifolii.

J. Bact. 116, 1177

OHTSUBO, H., NYMAN, K., DOROSZKIEWICZ, W. und OHTSUBO, E. (1981): Multiple copies of iso-insertion sequences of IS1 in Shigella dysenteriae chromosome.

Nature, 292, 640

PFLEIDERER, K. (1983): Persönliche Mitteilung

PRIEFER, U. (1980): Das Insertionselement ISR1 aus Rhizobium lupini und seine mutagene Aktivität im Resistenzplasmid RP4, Dissertation, Universität Erlangen

PRIEFER, U., BURKARDT, H. J., KLIPP, W. und PÜHLER, A. (1980): ISR1: An insertion element isolated from the soil bacterium Rhizobium lupini.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Seite 87

RAM, J. und KUMAR, S. (1979): Host dependence of RP1 resistance to ampicillin: differential expression in Escherichia coli and Rhizobium leguminosarum.

Gene. 7, 349

- REIF, H. J. (1981): Persönliche Mitteilung
- RIGBY, P. N. J., DIECKMAN, M., RHOADES, C. und BERG, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity by nick-translation with polymerase I.
- J. Mol. Biol. 113, 237
- ROEDER, G. S., FARABAUGH, P. J., CHALEFF, D. T. und FINK, G. R. (1980): The origins of gene instability in yeast.
- Science, 209, 19
- RUVKUN, G. B., LONG, S. R. MEADE, H. M., VAN DEN BOS, R. C. und AUSUBEL, F. M. (1982): ISRm1: A Rhizobium meliloti insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes.
- J. Mol. Appl. Gen. 1, 405
- SAEDLER, H. (1983): Persönliche Mitteilung
- SAPIENZIA, C. und DOOLITTLE, W. F. (1982): Unusual physical organization of the Halobacterium chromosome.
- Nature, 295, 384
- SAPIENZIA, C., ROSE, M. R. und DOOLITTLE, W. F. (1982): High-frequency genomic rearrangements involving archaebacterial repeat sequence elements.
- Nature, 299, 182
- Shapiro, J. A. (1979): Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements.
- PNAS, 76, 1933
- SHAPIRO, J. A. und CORDELL, B. C. (1982): Eukaryotic Mobile and repeated elements.
- Biol. Cell 43, 31
- SIMON, M., ZIEG, J., SILVERMAN, M., MANDEL, G. und DOOLITTLE, R. (1980): Phase Variation: Evolution of a controlling

element.

Science, 209, 1370

SIMSEK, M., DAS SARMA, S., RAJBHANDARI, U. und KHORANA, H. G.
(1982): A transposable element from *Halobacterium halobium*
which inactivates the bacteriorhodopsin gene.

PNAS, 79, 7268

SOUTHERN, E. (1975): Detection of specific sequences among
DNA fragments separated by electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503

SOUTHERN, E. (1979): Gelelectrophoresis of restriction frag-
ments.

in Methods in Enzymology 68, 152

STANISISCH, V. A. und BENNET, P. M. (1976): Isolation and
characterization of deletion mutants involving the transfer
genes of P group plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*.

Mol. Gen. Genet. 149, 211

SUTTON, W. D., PANKHURST, C. E. und CRAIG, A. S. (1981):
The *Rhizobium* bacteroid state.

in International Review of Cytology, Supplement 13, Seite 149

TEMPE, J. und PETIT, A. (1983): La Piste des opines.

in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction; ed.
A. Pühler; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 14

VANCE, C. P. (1983): *Rhizobium* infection and nodulation: a
beneficial plant disease?

Ann. Rev. Microbiol. 37, 399

VERMA, D. P. S. und Long, S. (1983): The molecular biology
of *Rhizobium* legume symbiosis.

in International Review of Cytology, Supplement 14, Seite 211

WAHL, G. M., STERN, M. und STARK, G. R. (1979): Efficient
transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyl-
oxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.

PNAS, 76, 3683

WILLMITZER, L., DHAESE, P., SCHREIER, P. H., VAN MONTAGU, M.
und SCHELL, J. (1983): Transcription of T-DNA in octopine
and nopaline crown gall tumors.

in Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction; ed.
A. Pühler; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 313

WINKLER, K. (1984): Wirtskontrollierte Restriktions- und
Modifikationssysteme in Rhizobiaceae.

Dissertation, Universität Erlangen

YOUNG, J. R., DONELSON, J. E., MAJIWA, P. A. O., SHAPIRO, S.
Z. und R. O. Williams (1982): Analysis of genomic rearrange-
ments associated with two variable antigen genes in Trypano-
soma brucei.

Nucl. Acid Res. 10, 803

ZAMBRYSKI, P., GOODMAN, H. M., VAN MONTAGU, M. und SCHELL, J.
(1983): Agrobacterium tumor induction.

in Mobile Genetic Elements; ed. J. Shapiro; Academic Press;
Seite 506

Herrn Prof. Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung des Themas, seine Betreuung, Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft, sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Fleckenstein möchte ich dafür danken, daß ich radioaktive Versuche im Isotopenlabor des Instituts für klinische Virologie durchführen konnte.

Äußerst hilfreich für die Durchführung des elektronenmikroskopischen Teils dieser Arbeit war die Einführung in die Carbonatspreitung und die Diskussionen und Anregungen von Herrn Dr. R. Lurz (Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin) und Herrn Dieter Kapp (Institut für Mikrobiologie, Erlangen).

Weiter möchte ich mich bei allen übrigen Mitgliedern des Instituts für ihre Diskussionsbeiträge und Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonders danke ich Dagmar Schillik für die gute Zusammenarbeit und die Bereitschaft zu jeder Zeit zu diskutieren und zu helfen.

Lebenslauf:

Name: Barbara Rüger, geb. Hasselmann

Geburtstag: 14. 8. 1953

Geburtsort: Nürnberg

Eltern: Otto Hasselmann, kaufm. Angestellter
Ruth Hasselmann, geb. Burzlauer

Familienstand: verheiratet seit 20. 12. 1977

Schulen: Sept. 1959 - Juli 1963 Volksschule in Nürnberg
Sept. 1963 - Juni 1973 Sigena Gymnasium in
Nürnberg
8. 6. 1973 Reifezeugnis des Sigena Gymnasiums in
Nürnberg

Studium: Okt. 1973 - Okt. 1979 Studium der Biologie an der
Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen-
Nürnberg
9. 2. 1976 Diplom-Biologen Vorprüfung
22. 10. 1979 Diplombiologen Hauptprüfung
Thema der Diplomarbeit: Untersuchung eines Plas-
midsystems (pP537) aus Salmonella typhimurium,
das für Enterotoxinproduktion codiert.

Berufstätigkeit: Okt. 1979 - Dez. 1980 Arbeit auf dem Gebiet der
Enterotoxinproduktion humanpathogener Salmonellen
am Institut für Mikrobiologie in Erlangen

Promotion: Jan. 1981 - August 1983 Durchführung des experi-
mentellen Teils der Dissertation am Institut für
Mikrobiologie, Erlangen.
Thema der Dissertation: IS-Elemente und Genom-
umstrukturierung bei Rhizobiaceae

Berufstätigkeit: seit Sept. 1983 wiss. Mitarbeiter am Institut
für klin. Virologie, Erlangen

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen